

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1936

THÈSE

N° 829

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PRÉSENTÉE PAR

Jean MANNONI

Né le 8 Juillet 1907 à QUASQUARA (Corse)

**Réactions de Séro-Floculation
dans le Paludisme**

Réaction de Henry et modifications

Président : M. BRUMPT, Professeur

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1936

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1936

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PRÉSENTÉE PAR

Jean MANNONI

Né le 8 Juillet 1907 à QUASQUARA (Corse)

Réactions de Séro-Floculation dans le Paludisme

Réaction de Henry et modifications

Président : M. BRUMPT, Professeur

PARIS
VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS
23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1936

I. — Professeurs

	MM
Anatomie	ROUVIERE
Physiologie	Léon BINET
Physique médicale	STROHL
Chimie médicale	DESGREZ
Bactériologie	Robert DEBRE
Parasitologie et histoire naturelle médicale	GRUMPT
Pathologie médicale et générale	BAUDOUIN
Pathologie médicale	ABRAMI
Pathologie chirurgicale	CHEVASSU
Anatomie pathologique	ROUSSY
Histologie	CHAMPY
Pharmacologie et matière médicale	THIÉNEAU
Thérapeutique	HARVIER
Hygiène et médecine préventive	TANON
Médecine légale	BALTHAZARD
Histoire de la médecine et de la chirurgie	LAIGNEL
	LAVASTINE
Pathologie expérimentale et comparée	FIESSINGER
Hydrologie thérapeutique et climatologie	MAUR. VILLARET
	LOEPER
Clinique médicale	CAKNOT
	CLERC
	Marcel LABBE
Hygiène et clinique de la première enfance	LEREBOULLET
Clinique des maladies des enfants	NOBECOURT
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale	H. CLAUDE
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN
Clinique des maladies infectieuses	LEMIERRE
	CUNEO
Clinique chirurgicale	GOSSET
	GREGOIRE
	LENORMANT
Clinique ophtalmologique	TERRIEN
Clinique urologique	MARION
	BRINDEAU
Clinique d'accouchements	COUVELAIRE
	JEANNIN
Clinique gynécologique	MOCQUOT
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	OMBREDANNE
Clinique thérapeutique médicale	RATHERY
Clinique oto-rhino-laryngologique	LEMAITRE
Clinique thérapeutique chirurgicale	Pierre DUVAL
Clinique propédeutique	SERGEANT
Clinique de la Tuberculose	BEZANCON
Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte	MATHIEU
Cardiologie clinique	LAUBRY
	HOVELACQUE
Professeurs sans chaire	MULON
	OLIVIER
	VERNE

II. — Agrégés en exercice

MM	MM
AMELINE.....	Pathologie chirurgicale.
BARIETY	Pathologie médicale.
BENARD Henri	Pathologie médicale
BERNARD Et...	Pathologie médicale.
BESANCON (J.)	Hydrologie.
BOULIN	Pathologie médicale.
BULLIARD	Histologie.
CATHALA	Pathologie médicale.
CHEVALLIER ..	Pathologie médicale
COSTE	Pathologie médicale.
DOGNON	Physique.
FEY	Urologie.
FUNCK-	
BRENTANO	Pathologie chirurgicale.
GALLIARD	Parasitologie.
GASTINEL	Bactériologie.
	DE GAUDART
	O'ALLAINES. Pathologie chirurgicale.
	DE GENNES... Pathologie médicale.
	GAYET
	GIROUD
	HAGUENAU ... Pathologie médicale
	HALPHEN Oto-rhino-laryngologie
	HAZARD
	HUGUENIN Anatomie pathologique
	JOANNON
	LABBE Henri.. Chimie biologique
	LACOMME Obstétrique.
	LANTUEJOL... Obstétrique
	LAROCHE Guy.. Pathologie médicale
	LELONG



MM.

LEMAIRE Pathologie expérimentale.
 LEVEUF Pathologie chirurgicale.
 LEVY (M^{re} J) .. Pharmacologie.
 LEVY-VALENSI. Neurologie et Psychiatrie.
 MENEGAUX .. Pathologie chirurgicale.
 MOLLARET ... Pathologie médicale.
 MOREAU Pathologie médicale.
 MOULONGUET. Pathologie chirurgicale.
 MOUQUIN Pathologie médicale.
 OBERLING Anatomie pathologique.
 PETIT-
 DUTAILLIS. Pathologie chirurgicale.

MM.

PIEDELIEVRE. Médecine légale
 PORTES Obstétrique.
 RENARD (L.). Ophtalmologie.
 RICHET Physiologie.
 SANNIE Chimie biologique.
 SENEQUE Pathologie chirurgicale
 TROISIERS Pathologie expérimentale
 TURPIN Pathologie médicale.
 VIGNES Obstétrique.
 WILMOTH Pathologie chirurgicale

III. — Agrégés rappelés à l'exercice pour le service des examens

MM.

ALGLAVE Pathologie chirurgicale
 BUSQUET Pharmacologie
 CHAILLEY-
 BERT Physiologie

MM

LEROUX Anatomie pathologique
 NEVEU-
 LEMAIRE Parasitologie
 PHILIBERT . Bactériologie.

IV — Agrégés chargés de cours de clinique annexe à titre permanent

MM.

ALAJOUANINE. }
 AUBERTIN }
 BRULE }
 CHABROL }
 CHIRAY }
 DONZELOT } Clinique médicale
 DUVOIR }
 LIAN }
 VALLÉRY-RADOT }
 (Pasteur). }
 SEZARY }

MM.

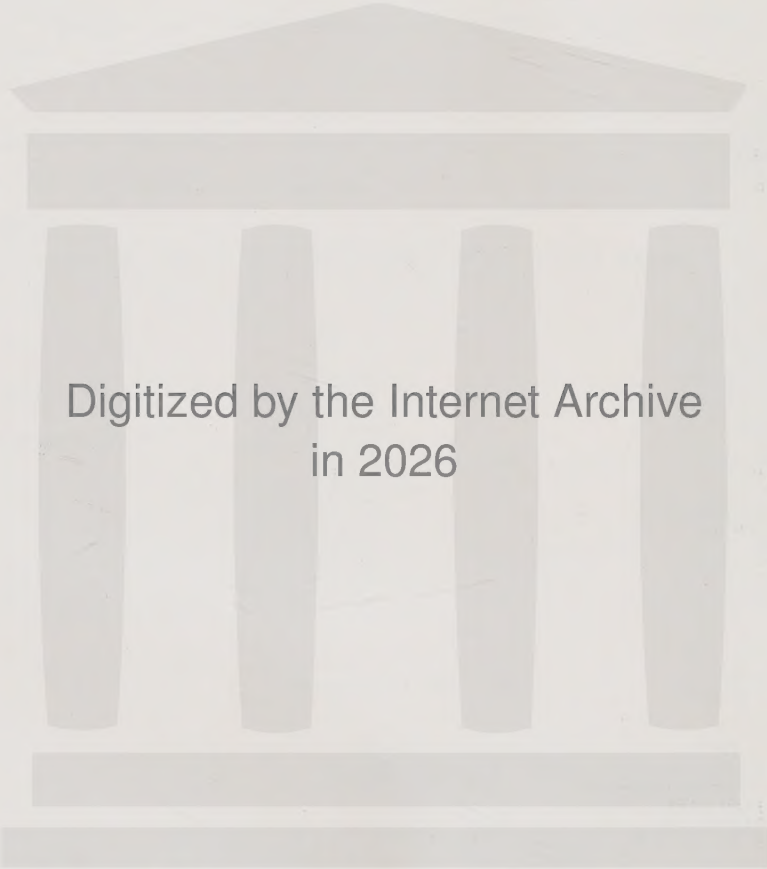
BASSET }
 BROcq }
 CADENAT }
 GATELLIER }
 HEITZ-BOYER. } Clinique chirurgicale
 MOURE }
 QUÉNU }
 SCHWARTZ .. }
 VELTER }
 ECALLE }
 GUÉNIOT }
 LE LORIER } Clinique obstétricale
 LEVY SOLAL }
 METZGER }

V — Chargés de cours

MM.

CHAILLEY-BERT, agrégé. Education physique
 LEDOUX-LEBARD Radiologie clinique
 PHILIBERT, agrégé..... Stomatologie.
 RUPPE Microbiologie.
 WEIL-HALLE Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549904_0031

A MA FEMME

Qui a su s'imposer, à mes côtés, pendant toute une année, des heures de souffrance et de sacrifice. Sa présence, seule, a été pour moi le meilleur des réconforts.

Je lui dédie cette thèse en témoignage de mon grand amour.

A MON PERE, A MA MERE

Parents très chers, à qui je dois tout.
Bien faible témoignage de mon affection
et de toute ma reconnaissance.

A MES BEAUX-PARENTS

Que j'unis dans le même sentiment
d'amour filial.

En témoignage de mon affection et
de ma reconnaissance.

A MES PARENTS, A MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

M. LE PROFESSEUR BRUMPT

*Professeur de Parasitologie et d'Histoire Naturelle Médicale
à la Faculté de Médecine de Paris*

Qui nous a fait le grand honneur
d'accepter la présidence de cette thèse,
nous adressons l'expression de notre
respectueuse gratitude.

AU MÉDECIN LIEUTENANT-COLONEL LE BOURDELLES

Professeur au Val-de-Grâce

Qui nous a guidé dans ce travail et
n'a jamais cessé de nous prodiguer
tous ses précieux conseils.

En témoignage de respectueuse
reconnaissance.

A M. LE DOCTEUR SAUTET

Professeur agrégé à la Faculté de Marseille

A qui nous devons le sujet de cette
thèse ; qu'il trouve ici l'expression de
notre profonde reconnaissance.

A NOTRE MAÎTRE M. LE PROFESSEUR LOEPER

*Professeur de Clinique Médicale
à la Faculté de Médecine de Paris
Membre de l'Académie de Médecine
Commandeur de la Légion d'Honneur*

Hommage de respectueuse affection
et de reconnaissance pour l'intérêt
qu'il a bien voulu nous témoigner au
cours de toutes nos études.

AU DOCTEUR ANDRÉ LEMAIRE

*Professeur Agrégé à la Faculté de Médecine de Paris
Médecin des Hôpitaux*

Témoignage de notre profonde gra-
titude.

A MES MAITRES DANS LES HOPITAUX

Réactions de Séro-Floculation dans le Paludisme

Réaction de Henry et modifications

INTRODUCTION

En 1880, à l'Hôpital militaire de Constantine, Laveran découvrait l'hématozoaire du paludisme.

La diagnostic de cette affection entraînait dans une voie nouvelle. Cette découverte allait permettre non seulement de corroborer le diagnostic des formes classiques et bien connues de la maladie, mais encore de rapporter à leur véritable cause les formes si nombreuses, atypiques, camouflées, larvées de cette pyrexie si polymorphe.

Malheureusement, la constatation du parasite dans le sang circulant est loin d'être constante et alors même que le diagnostic clinique ne fait aucun doute, les réponses du laboratoire peuvent rester négatives, pendant les accès, entre les accès surtout lorsque la maladie est entrée dans sa phase de chronicité.

De nombreux auteurs dirigèrent alors leurs investigations vers l'étude sérologique du paludéen. De 1900 à 1927, de nombreux travaux, que nous ne ferons que citer au chapitre de l'historique, furent publiés aussi bien en France qu'à l'étranger. Aucune de ces méthodes n'est restée dans la pratique courante.

En 1927, dans cette même ville de Constantine, le Docteur Henry proposait, pour le diagnostic du paludisme, une réaction sérologique basée sur la flocu-

lation du sérum en présence de mélanine et de certaines substances organiques contenant du fer. Nous exposerons plus loin dans tous ses détails cette réaction de floculation.

Depuis cette date, la réaction de Henry, tantôt suivie scrupuleusement, tantôt modifiée suivant les auteurs, n'a cessé de donner à ceux qui l'employèrent, des résultats toujours concordants. De nombreuses statistiques ont été publiées qui ne laissent plus le moindre doute quant à sa valeur. La malariefloculation est actuellement entrée dans la pratique courante de tous les centres antipaludiques civils et militaires.

De nombreuses théories sont nées qui ont essayé d'expliquer le mécanisme de cette réaction. Des variantes et des modifications ont été apportées à la technique, et aux réactifs eux-mêmes.

Nous nous proposons, dans ce modeste travail, suivant les conseils de M. le Docteur Sautet, Professeur agrégé à la Faculté de Médecine de Marseille, d'exposer les théories et les techniques récentes, afin de donner, dans un but exclusivement pratique, une idée générale de ce que sont actuellement les réactions de séro-floculation dans le paludisme.

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude à M. le Professeur Brumpt, qui nous a ouvert les portes de sa bibliothèque et qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Nos remerciements les plus respectueux vont également au médecin Lieutenant-Colonel Le Bourdelles, Professeur au Val-de-Grâce, qui nous a réservé un si bon accueil dans son laboratoire et qui nous a aidé de tous ses précieux conseils dans l'élaboration de ce travail inaugural.

HISTORIQUE

C'est à Celli que revient le mérite d'avoir le premier attiré l'attention sur la sérologie palustre. En 1899, il s'est efforcé de trouver dans le sérum paludéen un signe caractéristique de l'infection palustre. Cherchant à mettre en évidence les propriétés agglutinantes du sérum vis-à-vis des parasites, cet auteur n'eut aucun résultat positif.

En 1901, Lomonicho et Panichi signalent que le sérum paludéen, dilué au $1/5^{\circ}$, a la propriété d'agglutiner les hématies d'autres paludéens ou de sujets sains. Cette agglutination allant même jusqu'à disparaître lorsqu'on ajoute au sérum une dose minime de quinine.

Plus intéressantes sont les recherches d'Abrami et Senevet en 1917. Voulant expliquer le mécanisme de l'accès palustre, ces auteurs démontrèrent les propriétés lytiques extrêmement actives du sérum, à l'égard des formes plasmodiales du parasite. C'est ce qu'ils ont appelé le phénomène de Schizontolyse. La fin de l'accès serait due à l'apparition dans le sang de ces propriétés lytiques, le parasite prenant alors sa forme de résistance, le gamète, sur lequel les schizontolysines seraient sans action. Les rechutes seraient dues à la disparition ou à l'atténuation de ces schizontolysines.

A son tour Carnot, en 1919, reconnut au sérum palustre des propriétés schizontolytiques qui n'apparaîtraient qu'en fin d'accès.

De Blasi, en 1907, entreprit l'étude de la réaction de déviation du complément sur le sérum des paludéens ; utilisant comme antigène un sang riche en parasites, il obtint des résultats peu satisfaisants.

Quelques années plus tard, le même auteur étudia la réaction de Wassermann chez le paludéen. D'après ses résultats, la positivité de la réaction serait assez élevée, mais d'une façon toute temporaire, ce qui n'enlèverait rien à la valeur du Wassermann dans le diagnostic de la syphilis.

Ce n'est qu'en 1927 que le Docteur Henry proposa, au Congrès de l'Avancement des Sciences, de Constantine, un nouveau procédé d'examen sérologique de la malaria.

S'appuyant sur une hypothèse que nous exposerons plus loin, il constata que le sérum des paludéens flocculait en présence de certaines suspensions de mélanines naturelles et de certains composés ferriques.

Après une période d'hésitation et de scepticisme, de nombreux auteurs français et étrangers se mettent à contrôler et à vérifier l'exactitude de la réaction. Le Bourdélles de Liégeois, les premiers, publient en 1928 des résultats très intéressants et confirment la valeur de la mélano-floculation. Cartana en Espagne, Sabatucci et Corradetti en Italie, Kappus en Allemagne, apportent de nouvelles preuves et des résultats toujours concordants.

La mélano-floculation ne tarda pas à devenir non seulement une réaction de diagnostic, mais encore un moyen de contrôle thérapeutique et épidémiologique.

Au cours de ces dernières années, plusieurs auteurs, partant de l'idée que la mélanine, réactif d'Henry, était d'une préparation et d'un maniement difficiles, et dont la stabilité hors glacière n'avait pas encore été réalisée, furent amenés à préconiser l'emploi d'autres réactifs.

C'est ainsi que Trenszt, en 1935, propose l'emploi d'une mélanine purifiée, solubilisée par la soude, et donne la technique d'une nouvelle réaction.

Presque aussitôt, Greig et ses collaborateurs, annonçaient la préparation d'une mélanine de cheveux, rendue soluble par l'acide chlorhydrique, et Henry rapportait ses recherches sur une mélanine choroïdienne solubilisée par l'antiformine.

Villain (1936) conseille une mélanine artificielle, obtenue par voie chimique, ce qui donnerait au réactif une valeur toujours identique à elle-même et normaliserait les résultats.

Chorine, tout récemment, à l'Institut Pasteur de Paris, constatant que le sérum de paludéens dilué au 1/10^e flocculait en présence d'eau distillée, préconise une technique photométrique à l'eau distillée.

Enfin, partant de ce même principe, d'autres auteurs se servent d'indicateurs variés, qui ne feraient qu'objectiver macroscopiquement une flocculation visible seulement au photomètre.

Ce sont ces différentes méthodes que nous allons tâcher d'exposer le plus clairement possible, en insistant particulièrement sur la pratique de chacune d'elles.

Au moment où nous allions terminer notre travail, nous apprenions que le Docteur Henry publiait un nouveau mode de préparation, permettant d'obtenir une mélanine ferrique stabilisée, puis une nouvelle technique simplifiée, la flocculation pouvant être observée à l'œil nu et au photomètre.

Cette nouvelle technique très commode est destinée à remplacer l'ancienne technique qui ne conserve par conséquent qu'un intérêt historique.

Nous exposerons donc cette nouvelle technique d'Henry qui, à l'heure actuelle, semble la technique de choix, d'après les essais auxquels nous avons pu assister nous-mêmes dans les Laboratoires de l'Institut Prophylactique.

DONNEES

SUR LES PIGMENTS PALUSTRES

De l'étude anatomo-pathologique des lésions viscérales produites par le paludisme, il résulte que cette affection se caractérise par la formation dans l'organisme de deux sortes de pigments mis en évidence par Meckel, Laveran, Kelsh, Kiener et qui sont : le pigment mélanique ou pigment noir, d'une part ; le pigment ferrugineux ou pigment ocre, d'autre part.

La présence de ces pigments chez les paludéens étant à la base de la réaction de Henry, nous allons essayer de décrire leur nature et leur origine.

MELANINE

La substance mélanique est formée de grains noirs, soluble, dans les alcalis, insoluble dans l'eau, les acides, l'alcool, l'éther.

Bruno Bloch a démontré que la mélanine était une substance aminée oxydée. Cette constitution aminée est actuellement admise par tout le monde.

Par ailleurs, M. le Professeur Loeper a signalé que la présence de *soufre* est quasi constante, la plupart des dosages donnant de 1 à 9 % de soufre.

La mélanine serait donc, en définitive, une substance *thio-aminée*.

Ainsi définie, la mélanine, substance amino-acide

oxydée, n'est pas spéciale au paludisme puisqu'on la retrouve dans d'autres maladies diverses. Elle est également l'apanage du diabète bronzé, de la maladie d'Addison et, dans ces cas, elle a été l'objet de très belles études sur la mélanogénèse entreprises par le Professeur Loeper.

Néanmoins, la mélanine palustre semble être considérée comme une variété toute particulière de mélanine avec présence de fer. Il y aurait donc une mélanine spéciale au paludisme : l'hémozoïne.

L'origine de ce pigment est encore, à l'heure actuelle, l'objet de discussions et de diverses théories.

Meckel (1847) et Virchow (1849) considèrent que la rate est le principal siège de la substance mélanique. Planer (1856) avait aperçu des cellules pigmentées dans le sang. On discuta ensuite sur l'origine sanguine et sur l'origine splénique de la mélanine.

En 1876, Kelsh estimait que la destruction des globules rouges donnait lieu à la formation de pigments solubles, précipitant ensuite et pris par les leucocytes. En 1880, Kelsh considère les leucocytes pigmentés comme la caractéristique diagnostique de la malaria.

Après la découverte de Laveran, les auteurs discutent sur la formation du pigment noir par les parasites. Tour à tour, on fait intervenir une *enzyme*, dissociant l'hémoglobine (Brown 1911) : l'influence du noyau du parasite sur l'hémoglobine dans la vésicule nutritive (Comes - 1922). Pour Warasi (1929), la formation du pigment a lieu par catabolisme fermentatif de l'hémoglobine.

Si l'on parcourt alors la littérature, on observe deux tendances dans la manière de considérer le genre de formation et la signification du pigment mélanique.

a) *Théorie mélanique.*

La formation du pigment paludéen est assimilée à la formation des autres mélanines, celle de la peau par exemple, mais renfermant du fer dans sa molécule, avec un radical aminé.

Ross (1911) l'appelle Plasmodine. Askanazy (1919) la désigne sous le nom d'*hémomélanine*, par opposition à celle des tissus, de la peau, de l'œil, de certaines tumeurs, qu'il désigne sous le nom d'*Histomélanine*.

Et, tout récemment encore, Warasi (1927) estime qu'il faut considérer la mélanine palustre ou hémozoïne comme une mélanine ferrique. Il en donne une formule différente de celle de l'hématine ($C_{84} H_{152} N_{10} FeO_{82}$).

b) *Théorie de l'hématine.*

Carbone (1891), Ascoli (1910), se fondant sur des études spectroscopiques, assimilent au contraire l'hémozoïne à l'hématine. (Seyfarth, 1921-1926), Rocchi (1931), Wate et White (1932) ne purent confirmer ces faits.

Récemment, Sinton et Ghosh ⁽¹⁾ reprennent l'étude de l'hémozoïne en l'isolant du sang de singe très infecté avec Plasmodium Knowlesi.

Ils ne peuvent démontrer dans l'hémozoïne, du fer ionisable décelable par les réactions courantes dans l'hémosidérine.

Ils constatent du fer, non ionisable, qu'ils démasquent en traitant d'abord l'hémozoïne avec l'eau oxygénée, NO^3H acide-alcool et $(NH^4)^2S$.

Ces auteurs concluent en disant que l'hémozoïne est semblable à l'hématine.

⁽¹⁾ Studies on malarial pigments (Hemozoïn). — Record of the malaria Survey of India, mars 1934.

La question reste en somme à l'étude. On peut dire cependant que si l'hémozoïne se rapproche de la mélanine, c'est à son groupement aminé qu'elle le doit.

PIGMENT OCRE

HÉMOSIDÉRINE OU RUBIGINE

On le rencontre dans presque tous les viscères, mais plus particulièrement dans le foie, la rate, le cerveau.

Il se présente sous la forme de granulations inégales, de couleur ocre. Il est insoluble dans l'eau, l'alcool, l'éther. Il est soluble dans les acides minéraux et dans l'alcool-acide. On peut facilement mettre le fer en évidence, par les méthodes ordinaires (réaction du bleu de Prusse et réaction du sulfhydrate d'ammoniaque).

Son origine est également hémolytique. Il proviendrait de l'action de certaines hémolysines sur les globules rouges.

Ainsi donc, pigment ocre et pigment mélanique, quoique de constitution différente, ont une origine commune hémolytique :

« Débris de dislocation hématique, ces deux pigments sont couplés parce que leur souche est identique. »

La Réaction de Henry
Hypothèse de Henry
Techniques

PRINCIPES DE LA REACTION LES ENDOGENES

Quand un antigène venu de l'extérieur pénètre dans l'organisme, celui-ci réagit en sécrétant des anticorps. C'est sur ce principe que sont basées la mé-lano et la ferro-floculation.

Le Docteur Henry estime qu'en dehors des anti-gènes venus de l'extérieur, ou « exo-antigènes », il en est d'autres, qui sont produits dans l'organisme, au cours de processus pathologiques divers (infectieux, parasitaires ou autres). Tout comme les exo-antigènes, ces antigènes d'origine interne ou « Endo-gènes » peuvent provoquer dans l'organisme l'apparition d'anti-corps, les « anti-Endogènes ».

Or, les pigments palustres, dont nous avons parlé plus haut (pigment ocre et pigment mélanique), formés aux dépens des éléments cellulaires altérés par le développement de l'hématozoaire, peuvent être assimilés à de véritables endogènes, déterminant par suite dans le sérum la formation d'anti-endogènes, qui lui donneraient des propriétés spécifiques, et en particulier un pouvoir floculant.

Cette réaction serait donc une réaction spécifique, au sens biologique du mot, mettant en jeu un complexe antigènes-anticorps.

La théorie de Henry explique également le fait que la réaction est souvent négative au cours des accès fébriles.

A ce moment, il y aurait saturation de l'anti-endogène précipitant par l'endogène « jeté en masse dans la circulation sanguine ».

On se rend facilement compte de la difficulté, sinon de l'impossibilité d'obtenir, d'une façon courante, les vrais pigments mélaniques disséminés dans l'organisme.

Henry a été amené à les remplacer par des pigments homologues dont nous reparlerons bientôt et qui sont d'une part : une suspension de mélanine naturelle, homologue du pigment mélanique ; et d'autre part, une solution d'albuminate de fer, homologue du pigment ocre.

Mis en présence de ces antigènes homologues, le sérum de paludéens donne une floculation spécifique qui définit la réaction de Henry.

LA REACTION DE HENRY TECHNIQUE

La réaction de Henry comprend, en somme, deux réactions parallèles : la mélanofloculation et la ferrofloculation.

Depuis 1927, diverses modifications ont été apportées à la technique. Nous l'exposerons ici d'après les données les plus récentes de l'auteur lui-même. Nous nous attacherons surtout à l'étude de la mélanofloculation, considérée à juste titre, par la plupart des auteurs, comme étant la réaction la plus sensible.

Préparation de la mélanine en solution-mère

Recueillir en flacons aseptiques des yeux de bœufs abattus le jour même. On devra les utiliser le plus tôt possible.

On ouvre chaque œil, et après avoir éliminé le cristallin, on recueille dans un cristalliseur stérile le mélange de vitré et de pigment noir.

Retourner sur l'index en doigt de gant, le fond du globe oculaire ; scarifier finement la choroïde à l'aide d'un bistouri et la gratter pour recueillir le maximum de pigment mélanique.

Faire couler en même temps dans le cristalliseur le liquide visqueux encore adhérent aux membranes.

Ajouter à ce magma, par portions successives, **2**

volumes d'eau distillée. Triturer le tout avec un gros agitateur à bout rodé ou, au besoin, à l'aide de la main gantée de caoutchouc stérile, afin d'obtenir une émulsion aussi homogène que possible.

Laisser reposer pendant un quart d'heure, puis filtrer sur coton de verre, modérément tassé au fond d'un entonnoir. Centrifuger ensuite le filtrat à 4.000 tours environ pendant *une minute* seulement.

Le liquide surnageant est décanté, puis réparti en fioles stériles. Ajouter goutte à goutte du formol, en agitant, dans la proportion de 1 cc. pour 200 cc. d'émulsion.

Bien boucher les flacons et porter à la glacière, où ils devront séjourner au moins un mois, avant leur emploi définitif.

Le produit ainsi obtenu constitue l'émulsion-mère de mélanine. Il doit être agité énergiquement au moins deux fois par semaine.

Titrage de la solution-mère

Pour l'emploi, cette solution-mère devra être diluée, de façon à ce qu'elle présente une opacité sensiblement égale à celle d'un tube albuminimétrique correspondant à 0,23 — 0,25 par litre.

Si on se sert pour cette appréciation de l'appareil de Vernes, on devra obtenir une densité optique de 47-50.

En règle, le taux d'une bonne dilution ne devra pas être inférieur au titre de 1 pour 10.

Le Docteur Henry recommande en outre avec insistance de pratiquer des épreuves avec des dilutions voisines de 1/10, 1/10,50, 1/11, 1/11,50, 1/12. Ces diverses dilutions sont mises en présence de sérums

paludéens, de sérums normaux, de sérums de maladies diverses non paludéennes. Une comparaison est aussi faite avec une mélanine qui avait antérieurement fait ses preuves.

Préparation des dilutions

Le Professeur Le Bourdelles, ayant montré que le formol, utilisé pour la conservation de la mélanine-mère pouvait provoquer des floculations non spécifiques, proposa, le premier, l'emploi de tubes témoins formolés au même titre que les tubes réactions.

Pour cette raison, et dans le but de neutraliser l'acidité du formol contenu dans la mélanine, le Docteur Henry a recommandé de n'opérer qu'en solutions alcalinisées.

On utilisera la soude centinormale (NAOH N/100) que l'on verse, avant toute expérience dans les liquides diluants, à raison de 0 cc. 25 de soude N/100 pour 100 cc. de diluant.

On alcalinise ainsi :

- de l'eau distillée.
- une solution de chlorure de sodium à 3 p. 1.000.

On préparera ensuite les dilutions suivantes :

- | | |
|----------------------------------|-------|
| 1° — Mélanine mère | 1 cc. |
| — Eau distillée alcalinisée..... | 9 cc. |

La solution ainsi obtenue est désignée sous le nom de MÉLANINE A.

- | | |
|----------------------------------|-----|
| 2° — Mélanine mère | 0,5 |
| — Eau distillée alcalinisée..... | 9,5 |

Ce sera la MÉLANINE B.

- | | |
|---|-------|
| 3° — Mélanine mère | 1 cc. |
| — Eau salée à 3 p. 1.000 alcalinisée..... | 9 cc. |

ou MÉLANINE A'.

On préparera également les témoins :

- | | | |
|------|---|-------|
| 1° — | Solution de formol commercial à 1/200 | 1 cc. |
| — | Eau distillée alcalinisée..... | 9 cc. |
| 2° — | Solution de formol commercial à 1/200 | 1 cc. |
| — | Eau salée à 3 p. 1.000 alcalinisée..... | 9 cc. |

On remarquera que le Docteur Henry fait en somme deux séries de dilutions. Les unes dans l'eau distillée, les autres dans l'eau salée à 3 p. 1.000.

Klaussner a, en effet, montré que certains sérums, riches en globuline, précipitent au contact de l'eau distillée simple. C'est le phénomène de la surfloculance. L'eau salée stabilisant le sérum annule cette surfloculance. Si un sérum flocule en eau distillée, on ne tiendra compte pour la réaction que des modifications qui se passent en eau salée.

En présence de sérums hyperfloculants, on sera obligé d'élever le taux de la solution saline.

Utilisation du sérum

On emploiera le sérum à l'état frais, non chauffé. Le prélever à jeun. Le conserver au contact du caillot. Il ne doit pas dater de plus de trois jours. Il devra être clair. Les sérums opalescents ou hémoglobiniques sont à rejeter.

Les doses sont toujours identiques : 0 cc. 2 de sérum pour 1 cc. de mélanine diluée, ou témoin, sauf dans le cas de mélanine B où la dose de sérum sera de 0 cc. 3.

Matériel verrerie

Les réactifs seront prélevés et délivrés à la pipette de

Levaditi de 2 cc., divisée en 1/10 et 1/100 de cc. On se servira de tubes à hémolyse ordinaires de 13 $\frac{m}{m}$ $\times$ 5 $\frac{m}{m}$. Les tubes seront toujours disposés sur le porte-tubes, dans l'ordre indiqué dans le tableau suivant :

Répartir d'abord la mélanine, puis l'eau distillée ou salée. Le sérum ne sera versé qu'en dernier lieu. Après la répartition du sérum, on aura soin d'agiter énergiquement et on portera à l'étuve à 37° pendant 2 heures 3/4.

On laissera ensuite pendant 20 minutes à la température du laboratoire, après quoi on pourra pratiquer la lecture.

Réactifs en C M C	Eau distillée		Eau salée à 3 p. 1.000	
	Réaction		Réac- tion	Té- min
	1	2	3	4
Mélanine A	1,0	—	—	—
Mélanine B	—	0,9	—	—
Eau distillée alcalinisée	—	—	1,0	—
Mélanine A,	—	—	—	1,0
Eau salée alcalinisée	—	—	—	1,0
Sérum	0,2	0,3	0,2	0,2

Lecture

Saisir chacun des tubes entre le pouce et l'index par son extrémité supérieure, l'incliner légèrement et lui imprimer des mouvements de rotation sur lui-même deux ou trois fois dans les deux sens.

Effectuer ensuite deux renversements du tube, très lentement, sans aucune secousse. On élimine ainsi la sédimentation banale causée par certains sérums, tout en respectant la vraie floculation.

Placer le tube devant une lampe électrique (ampoule à verre non dépoli), sans abat-jour, et observer par transparence en inclinant le tube.

Lorsque la réaction est négative, le contenu du tube reste clair. Dans le cas contraire, on observe une floculation nette dans tous les tubes à réaction (1-2-4).

Il est évident qu'aucune floculation ne doit apparaître dans les tubes témoins. Ce cas peut pourtant se produire et se traduire par une floculation en eau distillée seulement ; la réaction en eau salée resterait alors seule valable. La réaction sera déclarée positive avec surfloculance du sérum.

Lorsque la surfloculance apparaît, même en eau salée, il faudra faire la réaction en employant des concentrations salines plus fortes (4/1000-5/1000). Si, grâce à ces concentrations croissantes, on arrive à faire disparaître la surfloculance en tube témoin, tout en ayant un flocculat net dans les tubes réaction, la réaction sera dite positive avec forte surfloculance.

On rejettera les réactions douteuses, ou qui se produiraient tardivement après la durée de trois heures indiquée plus haut.

TECHNIQUE

DE LA FERRO-FLOCCULATION

L'antigène utilisé est un albuminate de fer spécialisé, préparé par Merck, et connu sous le nom de « Ferrum albuminatum in Lamellis, n° 113 ».

Cet albuminate de fer est un peu plus sensible que le Métharfer Bouty, dont se servait Henry au début de ses recherches, et qu'on pourrait cependant employer, faute d'albuminate. Voici la préparation de l'antigène :

Verser 1 GRAMME d'albuminate de fer Merck dans un ballon de verre neutre. Y ajouter 500 cc. d'eau distillée. On porte au bain-marie et on chauffe à 55° en ayant soin d'agiter de temps en temps. Pour que la dissolution soit complète, il faut bien compter vingt-cinq minutes. Puis on porte à l'ébullition pendant dix minutes.

Après refroidissement, compléter à 600 cc. avec de l'eau distillée.

Cette solution, dont le titre est de 1 p. 600, sera répartie en ampoules de verre neutre, et stérilisée pendant quatre jours de suite à la vapeur fluente.

L'aspect de la solution ainsi obtenue est légèrement louche. Un trouble plus accentué traduira une altération quelconque et devra faire rejeter la préparation.

Cette solution-mère est agitée de temps en temps. Pour son emploi, on procédera à deux nouvelles di-

lutions, de façon à ce que l'on obtienne les taux respectifs de 1/1.200 et 1/1.500. Les liquides diluants seront l'eau distillée et l'eau salée. La dilution en eau salée étant destinée, comme nous l'avons dit à propos de la mélanofloculation, à stabiliser les sérums qui présenteraient une surfloculance en eau distillée. On emploie couramment une solution de NaCl à 1/1.000.

Le dispositif de la réaction est le même que celui de la mélanofloculation. Le tableau suivant indique les doses de réactifs et l'ordre dans lequel on doit opérer :

Réactifs en C M C	Réaction en eau distillée		Réaction en eau salée		
	Tubes réaction		Réac- tion	Té- moin	
	1	2	3	4	5
Sérums.....	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2
Albuminate de fer à 1/1200.....	1,0	—	—	—	—
Albuminate de fer à 1/1500.....	—	0,9	—	—	—
Eau distillée.....	—	—	1,0	—	—
Alb. de fer à 1/1500 en eau salée à 1/1000	—	—	—	1,0	—
Eau salée à 1/1000.....	—	—	—	—	1,0

Après agitation, les tubes sont portés à l'étuve à 37° pendant 2 heures 3/4, puis laissés 1/4 d'heure à la température du laboratoire. Dans le cas de réaction positive, on observe, dans les tubes réaction, la présence d'un fin précipité en suspension. Ce précipité peut parfois se coller au fond du tube. Dans ce cas,

il faudra agiter, pour le remettre en suspension. Une bonne floculation doit être nettement visible à l'œil nu.

Tout comme dans la mélanofloculation, les tubes témoins ne devront présenter aucun trouble, à moins qu'il n'y ait surfloculation du sérum en eau distillée, auquel cas on n'utilisera que la réaction en eau salée qui, comme nous l'avons dit, supprime cette surfloculation.

Différenciation sérologique du paludisme d'avec certaines maladies à sérum hyperfloculant (Typhus - Kala-Azar)

Dès 1928, Henry signalait l'influence du chauffage du sérum sur la réaction : « Pour pratiquer la ferrofloculation on emploie le sérum très clair, frais, non chauffé. Le chauffage atténue beaucoup l'activité des sérums. Pratiquer la réaction au sérum non chauffé. En outre, faire en même temps la réaction au sérum chauffé, en limitant le chauffage à 56° exactement pendant 5 minutes ».

Chorine a confirmé le fait. Il démontra que le chauffage à 55°, pendant 30 minutes, négativait, chez les paludéens, une mélanofloculation préalablement positive dans le sérum frais.

Le Docteur Henry propose donc ce moyen pour différencier le paludisme des autres affections capables de le simuler par une mélanofloculation positive.

Le chauffage préalable à 55° est porté actuellement à une heure.

Si le sérum floccule avant et après chauffage, c'est

qu'il s'agit certainement d'une surfloculation banale due à une affection, autre que le paludisme. Le chauffage, en effet, supprime la réaction palustre vraie, modifiant peu les fausses floculations.

On complétera donc la série des 5 tubes par 2 autres :

1 tube témoin: sérum chauffé + mélanine,

1 tube témoin: sérum chauffé + mélanine salée.

Doses : — 0 cc. 5 de sérum,

— 1 cc. de réactif.

Henry insiste beaucoup sur l'exécution minutieuse du chauffage, dont la durée a été récemment portée par lui à une heure.

On plongera le thermomètre à l'intérieur d'un tube de contrôle renfermant de l'eau et on agitera de temps en temps les tubes afin de bien répartir la température.

Lecture photométrique de la réaction

C'est en mai 1928 que le Docteur Henry préconisa, pour la première fois, la mensuration photométrique à l'étude de la floculation du paludisme. Il utilise le photomètre de Vernes-Bricq et Yvon (V.B.V.). D'après l'auteur même de la réaction, le photomètre apporte dans l'interprétation des résultats beaucoup plus de précision et permet d'éviter certaines erreurs dues à la macroscopie. Nous verrons plus loin que Trenszt est du même avis en ce qui concerne la précision des lectures et que sa réaction à la mélanine purifiée se fait exclusivement au photomètre.

Voici la technique de la lecture photométrique :

La réaction étant mise en train, comme nous l'avons indiqué, on adjoindra 3 tubes témoins généraux servant pour toute une série d'expériences.

On mettra ainsi dans un tube, 1 cc. de mélanine A et 0 cc. 2 d'eau physiologique (au lieu de sérum). Dans un deuxième tube, 0 cc. 9 de mélanine B et 0 cc. 3 d'eau physiologique. Dans un troisième tube, 1 cc. de mélanine A' et 0 cc. 2 d'eau physiologique.

On peut désigner ces 3 tubes témoins généraux par Tg₁, Tg₂, Tg₃.

Bien agiter les mélanges chaque fois que l'on aura distribué le sérum. Boucher les tubes (caoutchouc ou liège propre). Porter à l'étuve (réglée à 37°5 exactement), pendant 2 heures, puis retirer les tubes et les laisser 1/4 d'heure à la température du laboratoire.

Faire alors la lecture photométrique. On observe avec l'écran *Wratten n° 70*, en ayant la surcharge A à droite et O à gauche (OA). Avant de verser le contenu des tubes dans les cuves, on fera subir trois renversements assez forts pour homogénéiser.

Henry calcule la densité suivant une formule qu'il a établie un peu arbitrairement, mais qui donne, dans la pratique, les meilleurs résultats.

On note le chiffre d'opacité des différents tubes. Pour la mélanine en eau distillée, l'un des tubes donne un chiffre plus fort que l'autre. C'est le chiffre le plus fort qui sera choisi. Appelons-le Rd.

$$DO = Rd - \frac{Td + Tg}{2}$$

Td représente le chiffre d'opacité du témoin sérum-eau distillée.

Tg sera le chiffre donné par le tube témoin général, correspondant au tube réaction où la floculation est la plus accusée.

Chez les non paludéens, Do s'élève aux environs de 50. De 50 à 60, réaction douteuse. A partir de 60, réaction nettement positive.

REACTIONS SIMPLIFIEES

MICRO-METHODE

Toutes les fois que l'on a peu de sérum à sa disposition ou lorsqu'on veut se livrer à des réactions en série, intéressant une collectivité, le Docteur Henry conseille l'emploi de réactions simplifiées que l'on peut pratiquer suivant deux méthodes :

1° On peut réduire les quantités de sérum et de réactif en présence dans les tubes.

Exemple : 0,1 cc. de sérum pour 0,5 cc. de réactif ou de témoin, ou même 0,05 cc. (une goutte) de sérum pour 0,25 cc. (5 gouttes) de réactif.

On utilisera pour ces réactions non plus les tubes de Vernes, mais les petits tubes de 8 millimètres de diamètre.

2° On peut pratiquer une réaction en deux temps :

a) Epreuve d'essai : sérum + eau distillée. On laisse reposer 2 h. $\frac{3}{4}$ à l'étuve, puis 20 minutes à la température du laboratoire.

b) S'il n'y a pas de floculation, on se contente de l'épreuve définitive en eau distillée. Si, au contraire, le sérum est hyperfloculant, on ne pratiquera la réaction définitive qu'en eau salée.

Les autres Réactions de Séro-Floculation

Modifications de la Réaction de Henry

TECHNIQUE DE LA MELANO-FLOCCULATION AVEC DES MELANINES SOLUBLES

Nous avons vu que les lectures de la mélanoflocculation peuvent se faire soit à l'œil nu, soit au photomètre de Vernes. Henry lui-même a reconnu la supériorité de la lecture photométrique donnant plus de précision que la lecture macroscopique. Cependant, il avoue « qu'il est un peu délicat d'essayer une méthode photométrique en partant d'une suspension difficile à établir d'une façon toujours identique à elle-même et dans laquelle certains éléments autres que la mélanine peuvent intervenir ».

On pouvait donc envisager la préparation d'une mélanine soluble purifiée.

Dans une note préliminaire à l'Académie des Sciences (1934), Trensztz indiquait la préparation d'une mélanine solubilisée par la soude. Dans un autre travail plus étendu (Institut Pasteur d'Algérie, 1935), il donnait tous les détails de cette préparation.

Presque aussitôt, après la note de Trensztz, Greig et ses collaborateurs annonçaient la préparation d'une mélanine solubilisée par un acide.

Henry donnait alors les résultats qu'il obtenait avec une mélanine solubilisée par l'antiformine en appliquant la méthode que Loeschke avait proposée dès 1913 pour préparer des extraits de tumeurs.

Enfin, Villain et Dupoux donnent récemment (1935-1936) leur technique à la mélanine synthétique.

A. — MELANINE SOLUBILISEE PAR LES ALCALIS

a) MELANINE SOLUBILISEE PAR LA SOUDE

TECHNIQUE DE TRENSZ

Trensz s'est appliqué à préparer un réactif homogène, stable, et d'un titre constant, qui présenterait en outre les avantages d'une conservation facile.

Insoluble dans l'eau distillée, la mélanine se dissout dans les bases fortes (soude, potasse), et précipite en milieu acide. Aussi Trensz soumet la mélanine alternativement à des dissolutions dans la soude et à des précipitations par l'acide chlorhydrique à une température de 40°. La solubilité de la mélanine augmente ainsi à chaque dissolution. On obtient finalement un réactif absolument stable et qui serait aussi actif que le pigment brut.

Il possède en outre les avantages d'être purifié et débarrassé des protéines oculaires pouvant apporter des fluctuations fâcheuses. Précise et d'une activité constante, la mélanine purifiée peut se conserver facilement au frigorifique ; les échantillons sont encore utilisables après un an.

Avec un tel réactif, Trensz propose une technique spécifiquement photométrique afin de pouvoir tracer des courbes sérologiques comparables dans leur précision aux courbes sérologiques de la syphilis.

Préparation du réactif

La mélanine utilisée est la mélanine choroïdienne de l'œil de bœuf. Les yeux sont utilisés frais. On ouvre la cavité oculaire par une entaille transversale. On rejette le cristallin, le corps vitré et la rétine, pour ne conserver que la membrane choroïde.

Ces membranes seront broyées sur un tamis métallique fin, en ayant soin d'ajouter au magma de petites quantités d'eau distillée pour faciliter le passage des grains.

On obtient une suspension qu'on filtrera sur une couche de tarlatane doublée d'une mince couche de coton hydrophile. Ainsi on se débarrassera de quelques particules membraneuses qui auraient pu traverser le tamis.

Le filtrat est centrifugé : le culot est repris dans une solution de soude N/10 et placé à 40° pendant trois jours.

Les proportions seront de un litre de soude N/10 pour une quantité de pigment provenant de dix yeux de bœufs. On agite le mélange une fois par jour. Après trois jours, on procède à la première précipitation avec une quantité d'acide chlorhydrique nécessaire pour amener le pigment à la précipitation. On centrifuge.

On reprend ce culot par la soude N/10, comme pour la première opération et on laisse à 40° pendant deux jours.

On opère une deuxième précipitation par l'acide chlorhydrique ; on ne verse que la quantité minima d'acide.

On centrifuge de nouveau et ce dernier culot est repris dans une très petite quantité d'eau distillée, de façon à avoir une solution mère très concentrée.

On neutralise cette solution mère par de la soude, ajoutée goutte à goutte jusqu'à virage du papier de tournesol.

Se servir d'un papier de tournesol très sensible (papier Gallois). Amené à neutralité, le pigment se dissout complètement en quelques heures à la température du laboratoire.

On centrifuge ensuite la solution mère de façon à se débarrasser des particules de membranes choroïdes qui auraient pu être entraînées.

Le réactif est prêt pour le titrage.

Titrage du réactif

On se servira de l'appareil de Vernes afin d'obtenir un titrage d'une très grande précision. En effet, des variations, même très légères, dans le titre de la concentration, peuvent apporter de grandes fluctuations dans l'exactitude des réponses. Trensztz recommande de se servir pour le titrage d'une solution au 1/10 de la solution mère et d'employer au photomètre l'écran vert simple n° 74.

Manipulations du titrage

Pour la dilution au 1/10, se servir du rhéomètre de Vernes (une cylindrée de réactif pour neuf cylindrées d'eau distillée).

On vérifiera d'abord la propreté des cuves (cuves B). On remplit une cuve d'eau distillée et on note le chiffre de la densité optique lu en O/Λ à l'écran vert. Le titre recherché est de 73. Ce chiffre représente la densité optique propre du réactif au 1/10.

Si la cuve remplie d'eau distillée donne une densité

de 160, le réactif titré au 1/10 devra présenter avec la cuve une densité de $160 + 73 = 233$.

On ajoute donc, par petites quantités, de l'eau distillée à la solution mère concentrée, jusqu'à ce qu'on obtienne par tâtonnement la densité optique voulue ; à cette solution mère on ajoutera de l'acide phénique dans la proportion de 1/300.

Utilisation du réactif

Henry utilise pour sa réaction deux milieux différents, l'eau distillée d'une part, une solution de chlorure de sodium à 3 p. 1.000 et 5 p. 1.000 d'autre part.

Trensz n'emploie qu'un seul milieu. Il se sert du chlorure d'ammonium à 3 p. 1.000. D'après Trensz, la réaction dans ce milieu serait aussi sensible que celle de Henry dans l'eau distillée et nettement plus sensible que la réaction de Henry dans l'eau salée.

Pratique de la réaction

Matériel verrerie

On se sert des tubes de Vernes (60/13 $\frac{m}{m}$). Ils doivent être d'une propreté rigoureuse.

Pour les dilutions et la répartition du réactif, on aura recours au rhéomètre de Vernes (grand modèle, capacité 2 cc. à piston métallique).

Pour la répartition des sérums, on utilisera les pipettes de Kahn, graduées au 1/20 de cc., de la capacité de 1 cc. Elles seront rincées à l'eau distillée après leur emploi.

Prélèvement du sang

Le prélever à jeun. On conservera le sérum, sur le caillot, au frigorifique. On devra l'utiliser dans les 48 heures.

Dilution du réactif

Le réactif conservé à l'état concentré ne sera dilué au 1/10 dans le chlorure d'ammonium à 3 p. 1.000 qu'au moment de l'emploi. On pratiquera cette dilution au rhéomètre de Vernes (une cylindrée de réactif pour neuf cylindrées de la solution de chlorure d'ammonium).

Disposition des tubes

Dans cette réaction, le nombre des tubes est ramené à deux seulement : un tube « réaction » et un tube « témoin ».

Répartition du sérum et du réactif

Le sérum est réparti en premier lieu. On mettra dans chaque tube 0 cc. 25 de sérum. Pour la répartition du réactif, on se servira du rhéomètre, qu'on réglera à une capacité précise de 1 cc. On versera une cylindrée de chlorure d'ammonium à 3 p. 1.000 dans le tube témoin et une cylindrée de mélanine au 1/10 diluée dans le chlorure d'ammonium dans le tube « réaction ».

On agite avec soin immédiatement après avoir opéré le mélange.

Les tubes sont portés à l'étuve à 37°. Dans la première demi-heure qui suit, la floculation se traduit par un trouble dont l'intensité va en croissant. Dans

un deuxième temps, des flocons se forment et précipitent au fond des tubes.

Lecture des résultats

On pratique la lecture après deux heures de repos à l'étuve. Macroscopiquement, on peut avoir trois aspects :

1° Liquide transparent dans les deux tubes = réaction négative.

2° Trouble uniforme franc, dans le tube réaction, sans dépôt, témoin clair = réaction douteuse.

3° Sédimentation plus ou moins abondante dans le tube réaction, témoin clair ou légèrement louche = réaction positive.

Lecture photométrique

Avant d'introduire le liquide dans les cuves, on bouche l'orifice du tube, et on le retourne lentement d'un angle de 180° en une seule fois. Cette opération a pour but de remettre le précipité en suspension. Le liquide est alors versé dans la cuve sans aucune brusquerie, ce qui pourrait influencer sur la densité optique des précipités.

On se servira pour la lecture des flocculations de l'écran rouge *Wratten a*.

Calcul de l'indice sérologique.

$$IS = DR - (DT + DM)$$

IS = Indice sérologique.

DR = Densité optique de la réaction.

DT = Densité optique du témoin.

DM = Densité optique propre du réactif mélanique au dixième.

Évaluée à l'écran *Wratten a*, au lieu de l'écran vert, cette densité est de 23.

DM est donc, dans la formule, une constante égale à 23.

b) MELANINE RENDUE SOLUBLE PAR L'ANTIFORMINE (HENRY)

Henry a fabriqué lui-même une mélanine soluble en utilisant le puissant pouvoir solubilisant de l'antiformine. La technique est la suivante :

La mélanine insoluble de choroïde de bœuf est débarrassée du liquide qui la tient en suspension. Le culot de centrifugation est lavé deux fois à l'eau distillée sans l'agiter dans l'eau. On l'additionne ensuite de trente fois son volume d'antiformine à 20 %. On porte au bain-marie bouillant pendant 20 minutes.

Laisser le mélange au contact pendant 12 à 15 heures. Porter de nouveau au bain-marie bouillant pendant 20 minutes. Sauf quelques débris, la solution est à peu près complète ; on laisse reposer, on décante le liquide noir surnageant par siphonnage. On peut laisser sédimenter en opérant avec un flacon assez étroit et haut. L'addition d'alcool facilite la sédimentation. Ce liquide noir obtenu est neutralisé avec l'acide sulfurique N/12 ; on s'aperçoit qu'au moment de la neutralisation au tournesol le produit reste parfaitement en solution. En continuant à ajouter de l'acide sulfurique, on obtient une précipitation de la mélanine qui se dépose au fond du récipient.

Après avoir débarrassé le précipité du liquide acide surnageant, on le place dans de gros tubes à centri-

fuger ; on le lave deux fois à l'eau distillée (sans agiter). Le dépôt est ensuite dissous dans de l'eau très légèrement alcaline au tournesol en chauffant au besoin au bain-marie.

Si le liquide n'est pas complètement limpide, le laisser reposer, et l'on peut centrifuger.

Cette mélanine soluble est employée en la diluant de manière à obtenir à peu près la teinte de l'étalon de l'hémoglobininètre de Sahli.

Henry avait utilisé cette mélanine soluble et avait obtenu des résultats inférieurs à ceux qu'il obtenait avec la mélanine en suspension. Quand Trenszt eut publié ses résultats en utilisant le chlorure d'ammonium comme solvant, Henry employa ce sel avec sa mélanine en la comparant avec celle de Trenszt. Il note d'abord que le chlorure d'ammonium ne peut pas être employé avec la mélanine en suspension. Ce sel y fait apparaître des grumeaux et rend la technique impossible.

Avec la mélanine soluble, d'après Henry, le chlorhydrate d'ammoniaque, qui fait baisser considérablement la surfloculation banale dans un tube ne renfermant que du sérum et du solvant, la fait baisser beaucoup moins dans un tube renfermant de la mélanine.

On peut faire cette recherche soit sur un sujet n'ayant pas eu de paludisme, mais ayant un sérum présentant une très forte surfloculance banale, soit sur un sérum paludéen présentant en outre cette surfloculance.

En chauffant ce sérum une heure à 55°, on supprime la réaction palustre et on laisse subsister la surfloculation banale. On voit alors que la surfloculation ne peut être complètement supprimée dans un tube où il n'y a que le sérum et le solvant chloruro-ammonique. Au contraire, dans le tube qui renferme

de la mélanine et où la réaction palustre est supprimée, la surfloculance est peu modifiée. Le chiffre d'opacité du tube témoin sans mélanine étant très abaissé par rapport au tube avec mélanine, on sera amené à conclure à une réaction positive qui ne serait pas légitime. C'est ainsi que dans certaines cirrhoses et d'autres affections, Trensztz aurait des résultats positifs qu'Henry ne trouve pas avec sa nouvelle technique dans laquelle il a introduit un tube témoin renfermant mélanine et sérum chauffé une heure à 55°.

La question mérite des études de contrôle. On remarquera cependant que l'utilisation du chlorure d'ammonium possible avec témoin (mélanine-sérum chauffé), demande beaucoup de minutie.

Dans la technique de Villain à la mélanine artificielle, nous verrons que la correction du pH des solutions de chlorure d'ammonium est soigneusement effectuée et, d'autre part, Villain estime légitime le tube témoin proposé par Henry, et renfermant de la mélanine, comme le tube de réaction.

c) PROCEDE DE LOURTEAU

Lourteau, dans une thèse récente de Toulouse (1936), partant d'une mélanine soluble par la soude, propose une technique nouvelle.

Afin d'éliminer l'action non spécifique due à l'eau distillée, Lourteau réalise la réaction de Henry en dissolvant dans le sérum à examiner une certaine quantité de poudre soluble de mélanine.

Voici sa technique :

Pour effectuer la lecture au photomètre, on opère sur 1 cc. 5 de sérum. Dans un des tubes qui sert à réaliser la réaction, on place 3 cc. de solution vraie

de mélanine titrant 23° d'opacité propre, au photomètre, et on porte ce tube à l'étuve jusqu'à évaporation totale. On obtient une poudre qui reste adhérente aux parois du tube, mais s'en détachant facilement. Dans ce même tube, on introduit 1 cc. 5 de sérum frais, qui, après une légère agitation, dissout la poudre de mélanine. On lit aussitôt l'opacité au photomètre et on reporte le tube à l'étuve à 37°, pendant une heure et demie.

Après avoir laissé reposer un quart d'heure à la température du laboratoire, on fait une deuxième lecture. On obtient ainsi un chiffre d'opacité dont on retranche le premier chiffre constaté avant la mise à l'étuve. Avec des sérums négatifs par les autres méthodes, Lourteau a obtenu des différences d'opacité allant de 4 à 8. Avec des sérums positifs, il obtient des différences d'opacité allant de 18 à 30.

Lourteau estime que la zone de positivité doit se trouver vraisemblablement entre 10 et 15.

Cette technique a l'inconvénient d'employer une assez grande quantité de sérum, mais supprime l'inconvénient de la surfloculation dans les dissolvants. Il y aurait lieu de la soumettre à de plus amples recherches.

B. — MELANINE SOLUBILISEE PAR UN ACIDE

**MELANINE SOLUBLE DE GREIG, HENDRY
ET ROOYEN**

Préparation

25 grammes de cheveux humains sont brassés dans 100 cc. d'acide chlorhydrique à 50 % en volume pendant cinq à six heures. L'hydrolysate brun est filtré sur papier et le résidu insoluble rejeté.

Les cheveux noirs fournissent les meilleurs produits.

L'hydrolysate est distillé dans le vide pour éliminer l'acide volatil. Trois distillations sont nécessaires en ajoutant de l'eau chaque fois que le résidu devient pâteux. Le résidu est complètement soluble dans l'eau distillée et donne une solution brun noirâtre.

L'acide chlorhydrique restant dans ce liquide et une partie considérable des amino-acides présents sont éliminés en dialysant la mixture placée dans un sac de collodion sous l'eau courante.

Après six à dix heures (selon les résultats plus ou moins complets de la distillation dans le vide), la solution mélanique est seulement légèrement acide au papier de tournesol.

Transvaser la mixture du sac de collodion dans une capsule en porcelaine et ajouter progressivement de la soude (Na OH à 10 %) jusqu'à ce que l'on obtienne une réaction légèrement alcaline au tournesol.

S'il existe un précipité, il est dissous par ce traitement en chauffant si besoin au bain-marie. On peut ensuite filtrer si c'est nécessaire.

Dans tous les cas on obtient une solution brune limpide.

On répartit en tubes à stériliser par chauffage au bain-marie bouillant pendant 20 à 30 minutes. Sceller les tubes.

Cette solution colloïdale de mélanine se conserve indéfiniment. Elle ne donne pas de réactions positives à la ninhydrine. Elle ne renferme pas de fer, mais contient un composé sulfuré (donnant la réaction du nitro-prussiate après fusion avec du sodium).

Cette solution peut être comparée colorimétriquement avec une solution d'alun de fer à 10 % dans l'eau distillée. Greig et ses collaborateurs considèrent comme une unité de mélanine une solution donnant la teinte correspondant à celle de la susdite solution d'alun de fer. Une solution optima pour la réaction peut aller de 4 à 8 unités mélaniques titrées par dilution de la solution mère).

Technique

Dans un porte-tubes, on distribue une rangée de 10 tubes à Wassermann qui servent à faire des mélanges. On distribue une rangée parallèle de petits tubes étroits à agglutination.

Dans chaque tube à Wassermann (1 à 10 inclus), verser 0 cc. 4 d'eau distillée. Dans le tube 1, ajouter 0 cc. 4 du sérum à l'étude. Mélanger. De ce tube (dilution à moitié), prélever 0 cc. 4 et le transvaser dans le tube 2, et ainsi de suite jusqu'au tube 9. Prélever de celui-ci 0 cc. 4 et les rejeter.

Aux 10 tubes (1 à 10 inclus), ajouter 0 cc. 4 de mélanine.

Avec une pipette Pasteur, et en commençant pas le dernier tube (10), mélanger le contenu et transporter dans les tubes à agglutination correspondants.

Le tube 10 servant de contrôle (mélanine + eau distillée), on a dans les tubes 1 à 9 des dilutions successives de sérum de $1/4$, $1/8$, $1/16$, $1/32$, $1/64$, $1/128$, $1/256$, $1/512$, $1/1.024$.

Les mélanges doivent être clairs, sans particules en suspension.

Mettre à l'étuve pendant cinq heures.

Lecture des résultats

Le résultat est positif quand, à l'œil nu, on observe la présence de fins granules avec précipité au fond du tube et léger nuage dans le liquide surnageant. Le titre de réaction d'un sérum de malade au cours d'une tierce bénigne, est en général de $1/32$ à $1/128$, ce qui donne une information suffisante pour le diagnostic.

En Angleterre, la technique de Greig a été appliquée seulement à notre connaissance par Wiseman, qui a donné une note préliminaire peu explicite.

La préparation de cette mélanine apparaît un peu compliquée. Le dispositif exige de nombreux tubes dont la pratique en grand s'accommoderait mal. D'autre part, il n'y a pas de témoin sérum seul avec eau sans mélanine, et les dilutions successives du sérum font envisager des précipitations globuliniques qui, dans l'hypothèse d'une action spécifique de la mélanine doivent interférer avec celle-ci d'une façon peut-être irrégulière.

TECHNIQUE DE VILLAIN A LA MELANINE ARTIFICIELLE (M. A.)

Henry avait déjà signalé des essais de mélanine artificielle en oxydant de la leucine et de la tyrosine, et indiqué que l'on pouvait améliorer le produit par addition de sels de fer.

En 1935, Villain et Dupoux proposent, pour la mélanofloculation une mélanine artificielle, préparée par voie chimique, dans le but de permettre aux travailleurs non outillés la pratique de cette réaction vraiment indispensable. En effet les manipulations sont simplifiées à l'extrême et le titrage si délicat de l'antigène est supprimé.

La préparation de la M. A. est relativement facile et, de plus, le réactif préparé d'une façon toujours identique se montrerait d'une égale valeur comparative-ment à la mélanine en suspension.

Préparation de la mélanine artificielle

1° Introduire successivement dans un ballon très sec :

Tyrosine Poulenc	0 gr. 30
Perchlorure de fer (solution officinale).....	0 cm ³ 40
Eau oxygénée 12 vol.	10 cc.
Eau distillée	10 cc.

Boucher au coton. On agite vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Celle-ci est assez rapide et s'accompagne d'un dégagement de chaleur et de bulles gazeuses. On laissera la réaction se poursuivre pendant quinze minutes.

2° On porte ensuite à l'ébullition, qui devra être

modérée. On la maintiendra pendant *une minute*. A ce moment, la solution devient de plus en plus noire et opaque.

3° On verse le contenu dans un ballon de 250 cc. dans lequel on aura préalablement réparti 180 cc. d'eau distillée (préalablement bouillie et non refroidie). On procède alors à une nouvelle ébullition qui durera trois minutes.

4° Refroidir rapidement le ballon sous un courant d'eau ; laisser reposer une demi-heure, puis ajouter :

Solution de soude caustique N/1 : 3 cc. 20.

La soude dissout complètement le dépôt noir qui s'était formé.

Laisser reposer pendant douze heures à la température du laboratoire.

Filtrer sur papier mouillé à l'eau distillée. Le filtrat noirâtre, très foncé, mais limpide, débarrassé de toute impureté, constitue la mélanine artificielle. Répartir le liquide dans des flacons bien bouchés, et le maintenir à l'obscurité, sans qu'il soit besoin d'avoir recours à une glacière.

TECHNIQUE DE LA M.A. FLOCCULATION

La technique de Villain est macroscopique. Elle envisage l'utilisation de la réaction de Henry dans le bled en employant un réactif de conservation facile.

Matériel verrerie

Un flacon bien bouché de M.A., conservé au frais et à l'obscurité (solution mère).

Une solution de NH_4Cl à 4,5 ‰ à $\text{pH} \approx 7,0/7,2$ pour dilution de l'antigène.

Une solution de NH_4Cl à 9 ‰ à $\text{pH} = 7,0/7,2$ (pour dilution, réaction sérum et éventuellement pour dilution antigène).

Une solution de NH_4Cl à 4,5 ‰ ; $\text{pH} = 6,0/6,2$ (pour dilution témoin, sérum éventuellement).

Des tubes à hémolyse. Des pipettes de Levaditi de 1 à 2 cc., graduées au 1/10 et au 1/100 de cc.

Le sérum ne devra pas dater de plus de 48 heures. Il sera conservé au frais, au contact de son caillot.

. Précautions à prendre

La verrerie doit être d'une propreté et d'une siccité absolues. On disposera d'une pipette pour chaque réactif et chaque sérum. Dans le cas contraire, laver soigneusement les pipettes entre les changements de réactifs.

Le sérum sera ajouté en dernier lieu dans les tubes.

Dès qu'on aura réparti le sérum, il sera indiqué d'imprimer à chaque tube des mouvements de rotation afin d'homogénéiser le mélange.

Pour le tube n° 1 (dilution sérique), pratiquer à l'aide d'une pipette plusieurs aspirations et refoulements successifs.

Dispositif de la réaction

Si l'on veut pratiquer la différenciation par chauffage, on utilisera la méthode de Henry décrite au chapitre de la mélanofloculation.

L'antigène sera d'abord dilué au 1/5.

On se servira de petits flacons, dans lesquels on versera, pour 10 sérums par exemple :

Solution mère M.A. 3 cc.

Eau NH_4Cl 4,5 ‰ $\text{pH} = 7,0/7,2$.. 12 cc.

En cas de surfloculance, on ferait une dilution dans les mêmes conditions, mais en eau NH_4Cl au 9 ‰ au même pH .

Toutes ces différentes dilutions ne seront pas gardées pour un dosage ultérieur.

La marche à suivre pour la réaction est indiquée dans le tableau ci-dessous :

TECHNIQUE HABITUELLE

Réactifs à ajouter en cc ³ dans l'ordre de lecture ci-après : de haut en bas, de droite à gauche.	Dilution sérum 1	Réaction 2	Témoins	
			Sérum 3	Antigène 4
Eau NH ⁴ Cl à 9 0/00 pH = 7,0/7,2	0,9	—	—	—
Eau NH ⁴ Cl à 4,5 0/00, ph = 6,0/6,2	—	—	1,0	—
M.A. au 1/5 en eau NH ⁴ Cl à 4,5 0/00, pH = 7,0/7,2	—	1,0	—	1,0
Sérum non dilué	0,1	—	—	—
Sérum au 1/10 en eau NH ⁴ Cl à 9 0/0, p= = 7,0/7,2.....	—	0,2	0,2	
Pour chacun des sérums.				Pour chaque série (facultatif).

On agite soigneusement les tubes, puis on les laisse reposer à la température du laboratoire, qui ne doit pas s'abaisser au-dessous de 22°. On pratiquera la lecture et la notation des résultats à la troisième heure.

Dans le cas de surfloculance dans le tube n° 3, on recommencera l'opération suivant les indications consignées dans ce deuxième tableau :

Si, pour une raison quelconque, on suspecte de « fausses réactions positives » (Typhus exanthématique, Leishmaniose), on pratiquera le chauffage du sérum

Lecture, interprétation et notation des résultats

On examinera les tubes par transparence devant une forte lumière blanche (fenêtre, ampoule « opale »).

1° Culot très épais, noirâtre, tassé au fond du tube; liquide surnageant clair ou présentant encore de gros grumeaux : réaction fortement positive (+ + +).

2° Culot partiellement constitué ; nombreux culots plus ou moins volumineux, encore en suspension dans le liquide.

Réaction moyennement positive (+ +).

3° Sédimentation à peine amorcée (cercle brunâtre au fond du tube). Flocons parfaitement visibles, à l'œil nu, dans le liquide, donnant, sur un fond noir l'aspect de « neige ».

Réaction faiblement positive (+).

4° Ni dépôt, ni flocon dans le tube. Troubles, grumeaux, visibles seulement à la loupe.

Réaction douteuse ($\pm$).

5° Aucun trouble, aucune granulation.

Réaction négative (0).

Villain a donné des résultats très intéressants, basés sur l'examen de 393 paludéens. Ses conclusions sont les suivantes :

« Les deux méthodes de floculation aux mélanines artificielles et naturelles paraissent à peu près s'équivaloir. » « Leur spécificité et leur sensibilité sont du même ordre de grandeur. »

Il faut cependant reconnaître que la question du pH si importante d'après Villain, est un gros inconvénient de cette technique et peut apporter de grosses difficultés aux travailleurs du « bled ».

TECHNIQUE PHOTOMETRIQUE A L'EAU DISTILLEE DE CHORINE

Klaussner avait montré que certains sérums, syphilitiques en particulier, flocluaient dans l'eau distillée.

D'après Chorine, l'essentiel de la découverte de Henry, c'est d'avoir montré une aptitude spéciale des sérums paludéens à flocluer : floclabilité dans l'eau distillée qui n'est pas toujours perceptible à l'œil nu, mais que la mélanine, réactif choisi par Henry, a l'avantage d'extérioriser d'une façon commode et précise.

Nous verrons d'ailleurs que d'après Chorine la réaction de Henry serait due simplement à un déséquilibre colloïdo-cristalloïdien qui se traduirait par une instabilité du sérum dans l'eau distillée. Ainsi la mélanine ne serait réduite qu'au titre d'un simple indicateur objectivant macroscopiquement des floclations qui ne seraient pas appréciables à l'œil nu, mais que l'on peut très bien étudier grâce au photomètre.

Dans la technique de Chorine, on ne se sert d'aucun indicateur. Le sérum est mis simplement en présence d'eau distillé à une dilution convenable.

Voici la technique de cette réaction :

Le sérum doit être prélevé à jeun, gardé au contact de son caillot et examiné dans les vingt-quatre heures.

On répartit dans deux tubes à hémolyse d'une propreté parfaite 1 cc. 8 d'eau distillée. Chaque tube sera traité et examiné au photomètre séparément et dans le plus bref délai.

Pour cela, on ajoute à chaque tube contenant l'eau distillée 0 cc. 2 de sérum à examiner. On mélange rapidement, sans brusquerie, afin d'éviter la production de bulles d'air.

Le mélange est immédiatement versé dans la cuve du photomètre et on note le degré photométrique de son opacité.

Les tubes sont portés ensuite à l'étuve à 37° où ils devront séjourner trois heures, après quoi on les laissera reposer vingt minutes à la température du laboratoire.

On pratique alors une seconde lecture. Les résultats sont obtenus en retranchant le premier chiffre du second. Cette opération qui est faite en double ne devra pas comporter une différence de plus de 1 à 2 degrés. Pratiquement, on prendra leur moyenne.

Interprétation des résultats

Après de nombreuses expériences pratiquées sur des sérums normaux, syphilitiques et paludéens, Chorine est arrivé aux conclusions suivantes :

1° Les sérums présentant un chiffre de floculation inférieur à 10 sont négatifs ;

2° Entre 10 et 25, ils sont douteux ;

3° Au-dessus de 25, ils sont positifs.

Les résultats obtenus seraient voisins de ceux que donne la réaction de Henry, tout en présentant les mêmes défauts.

Ainsi avec des sérums de kala-azar, dans lesquels la réaction de Henry serait positive, la réaction de Chorine donne des différences photométriques de 100, 150 et plus. Chorine conseille de penser à cette affection toutes les fois que l'on obtient des chiffres aussi élevés.

Rappelons que Henry considère les réactions de floculation du Kala-azar et d'autres maladies à sérums hyperfloculants, comme de fausses floculations globu-

liniques banales que le chauffage ne fait pas disparaître.

L'instabilité du sérum paludéen en eau distillée n'est pas constante. D'autre part, il est des sérums instables en dehors du paludisme.

Il est à prévoir que plus on fera des recherches comparatives avec la réaction de Henry, tout en observant quelque parallélisme entre les deux propriétés, on sera amené à constater certaines différences dans les résultats, en employant la mélanine ou en se servant simplement d'eau distillée.

D'autre part, apparemment simple, la méthode à l'eau distillée nécessite une grande minutie. La moindre souillure des tubes peut, dans une expérience faite en double, donner des résultats fort différents dans deux tubes analogues. L'évolution de la floculation du sérum en eau distillée peut donc être facilement modifiée.

EMPLOI DE « L'INDICATEUR » AU CARMIN POUR LA SEROFLOCCULATION PALUSTRE

Greig, Henry et Rooyen ont signalé les premiers que l'on obtenait des réactions positives avec le bleu de méthylène, le phénol-sulfo-phtaléine, et le rouge de méthyle. Ces substances n'étaient employées que comme de simples indicateurs, objectivant l'instabilité des sérums paludéens en eau distillée.

Tout récemment, Prudhomme s'est adressé à une substance pulvérulente en suspension : le carmin.

Ce corps présenterait, en effet, en suspension dans l'eau, un signe électrique négatif, tout comme la mélanine à la dilution et au p_H où elle est employée dans la réaction de Henry.

Préparation de la suspension de carmin

On met dans un mortier 0,5 gr. de carmin R.A.L.
On broie finement.

On agite ensuite fortement pendant cinq minutes dans un ballon à perles à sec.

On ajoute alors 1 cc. d'eau distillée et on agite à nouveau deux minutes.

A ce moment, on ajoute 25 cc. d'eau distillée et on agite encore pendant deux minutes.

La suspension ainsi obtenue est centrifugée doucement pendant une minute. Cette opération a pour but d'éliminer les particules les plus grosses.

Le liquide surnageant est étendu de telle sorte que dilué au 1/10, il présente au photomètre une opacité de 30° plus forte que celle de la cuve remplie d'eau distillée.

Si on ne dispose pas de photomètre, voici le mode opératoire conseillé par Prudhomme :

Dissoudre 0,01 de Fuschine basique R.A.L. dans 100 cc. d'alcool absolu.

Cette solution diluée dans l'eau distillée à raison de 0,5 cc. pour 10 cc. d'eau donne, sur fond blanc, la teinte à laquelle doit être ramenée la suspension de carmin diluée au 1/10°, ce qui correspond à peu près à l'opacité photométrique obtenue par la méthode précédente.

Cette dilution se conserve, sans aucune altération une dizaine de jours, à la température du laboratoire.

Au moment de l'emploi, on la dilue au 1/10, et on pratique les réactions suivant la même technique de Henry, y compris le formolage et l'alcalinisation des tubes témoins.

Prudhomme conclut que les résultats sont au moins

aussi bons qu'avec la mélanine. Les lectures seraient plus aisées, la floculation plus volumineuse qu'avec la mélanine.

Cette technique, utile dans les laboratoires où l'on ne peut obtenir de mélanine, a l'inconvénient d'exiger la préparation d'un réactif tous les dix jours. Nous ignorons si des essais ont été effectués depuis sa publication.

TECHNIQUE RECENTE DE HENRY REACTIF MELANO-FERRIQUE

Au moment de mettre sous presse, nous apprenions que le Docteur Henry avait mis au point un nouveau réactif et une technique simplifiée que nous exposons ci-après.

Réactif

Dès 1932, Henry signalait à la Société de Biologie des essais d'addition de traces de sels de fer à la mélanine en suspension et à la mélanine solubilisée par l'antiformine. Après avoir utilisé plusieurs variétés de sels de fer, Henry est arrivé actuellement à un perfectionnement notable de ses réactifs qui sont tous à présent additionnés de sels de fer.

Henry emploie un glycéro-phosphate de fer ammoniacal fourni par les Etablissements Givaudan, La virotte, de Lyon.

Des solutions à 1/500 (1 p. 500) sont facilement réparties en ampoules, stérilisées par un chauffage quatre jours de suite à 100° pendant une heure. Ces solutions restent parfaitement limpides.

C'est surtout comme élément complémentaire de la mélanine d'œil de bœuf que ce sel de fer paraît très intéressant. Il régularisait, en effet, les propriétés des différents lots de réactifs fabriqués, et présenterait en outre l'avantage de ne pas réagir aux causes de surfloculation non spécifique.

Le taux de glycéro-phosphate de fer à ajouter à la mélanine est établi par tâtonnement. Il varie entre 0 cc. 20 et 0 cc. 25 de glycéro-phosphate à 1/500 pour 10 cc. de mélanine mère susceptible d'être diluée au moins au 1/10 pour la réaction (2 cc. à 2 cc. 5 p. 100) de solution au 1/500.

Si l'on veut utiliser la mélanine rendue soluble par l'antiformine, on augmentera légèrement la proportion de glycéro-phosphate de fer (ex. : 0,3 pour 10 cc. de mélanine mère soluble, à diluer au 1/10).

Ce réactif mélano-ferrique en suspension est solubilisé par chauffage à 52°, quatre à cinq jours de suite pendant quatre heures. On peut y ajouter, à titre d'anti-oxydant, une dose minime d'acide phénique. Dans la dilution d'usage pour la réaction, le taux ne devra pas dépasser 1/8000.

Ainsi préparé, le réactif mélano-ferrique conserve son titre pendant très longtemps (un an et plus).

Avant chaque séance de chauffage, on aura soin d'agiter les récipients (ampoules-flacons). On pratiquera également de nouvelles agitations au milieu et à la fin de la séance.

Cette stabilisation permet de constituer de grandes provisions de mélanine et de l'expédier au loin sans crainte d'altération.

Technique

Que l'on se serve de la mélanine ferrique en suspension, ou de la mélanine solubilisée par l'antiformine, la réaction emprunte un dispositif analogue. Henry a apporté une grande simplification à sa technique, sans porter préjudice à la sensibilité et à la spécificité.

Les dilutions des réactifs mélano-ferriques se font en eau salée à 1/900. On obtient ainsi une sensibilité suffisante tout en évitant le plus souvent la surfloculation banale. Pour écarter les causes d'erreur dues à certains sérums très instables (Typhus-Kala-azar), Henry introduit des témoins mélanine-sérum préalablement chauffé pendant une heure à 55° (et refroidi). Ainsi se trouve supprimée la vraie floculation spécifique, d'où un moyen diagnostic utilisable.

Henry introduit également un tube eau distillée-mélanine, qui traduit ce qu'il appelle l'index de stabilité sérique, la floculation en eau distillée étant pour lui un indice viscéropathique et d'instabilité colloïdale non spécifique, la floculation mélanique étant au contraire un indice de l'infection palustre.

Le dispositif de la réaction complète peut donc se résumer dans le tableau suivant :

Réactifs en C. M. C.	Tubes réactions		Témoins avec sérum chauffé		Index de stabilité sérique
	1	2	3	4	
Eau distillée.....	—	—	—	—	1 cc.
Mélanine diluée en eau salée à 90/00 ...	1 cc.	0,9	1 cc.	0,9	
Sérum chauffé à 55° pendant 1 heure	—	—	0,2	0,3	
Sérum frais	0,2	0,3			0,2

Placer les tubes sur deux rangs. Tube 3 derrière tube 1, tube 4 derrière tube 2.

Agiter énergiquement chaque tube après répartition. On porte à l'étuve à 37° pendant deux heures et demie (pour la méthode macroscopique). Ensuite laisser reposer à la température du laboratoire pendant vingt minutes.

On peut alors pratiquer la lecture suivant les indications fournies à propos de l'ancienne technique.

On considérera comme surfloculance banale, toute précipitation se produisant dans le tube mélanine-sérum chauffé.

Pour la lecture photométrique, on peut en général se contenter d'employer une seule dose de sérum : 0 cc. 25 dilué en eau salée à 1/750, pour 1 cc. de réactif mélanique. On note le résultat fourni par le tube mélanine-sérum frais et on déduit le chiffre donné par le tube témoin, mélanine-sérum chauffé.

Pour une différence d'opacité comprise entre 0 et 10, la réaction sera considérée comme négative ; entre 10 et 20, zone d'alarme, au-dessus de 21, réaction positive.

**Diverses théories sur le mécanisme
de la Réaction de Henry**

DIVERSES THEORIES SUR LE MECANISME DE LA REACTION DE HENRY

THEORIE DE HENRY

Nous avons vu que le Docteur Henry, dans l'élaboration de sa rédaction, était parti de l'hypothèse des « Endogènes ».

Au Congrès International du Paludisme (Alger 1930), il donna une explication du mécanisme de la mélando-floculation.

Cette réaction mettrait en jeu d'une part des produits se rapprochant d'antigènes spécifiques : substances ferriques et mélaniques ; d'autre part, des facteurs non spécifiques : eau distillée, colloïdes, qui diminuent la stabilité des dilutions en eau salée.

Malgré l'intervention de facteurs non spécifiques, Henry croit que l'influence de la spécificité ne doit pas être rejetée et il en donne plusieurs raisons :

1° Tout d'abord, malgré les essais faits avec les substances les plus diverses, ce sont celles qui se rapprochent le plus des pigments palustres qui donneraient les résultats les plus utilisables.

2° La mélando-floculation se trouverait positive en dehors du paludisme dans des circonstances absolument exceptionnelles. Elle serait au contraire à peu près spécifique du paludisme.

3° La surfloculance en eau distillée, phénomène

d'instabilité sérique, ne ferait que « compliquer les réactions immunologiques essentielles ». Henry pense que cette instabilité traduit un deuxième symptôme, peu spécifique, plus lésionnel qu'infectieux.

« La mélando-floculation resterait au contraire le signe sérologique primitif, essentiel, quasi spécifique et constant dans l'affection palustre. »

CRITIQUES DE L'HYPOTHESE DE HENRY

Cette conception est loin d'être admise par tous les auteurs et notamment la théorie des « Endogènes » qui sert de point de départ au Docteur Henry.

Comme le dit Meersseman, « le degré de parenté de l'antigène vrai et de la suspension mélanique peut être discuté ». Par ailleurs, on a pu observer des réactions positives au cours de certaines affections déterminant une destruction globulaire intense, sans qu'il soit possible d'envisager dans ces cas la question d'antigènes quelconques.

Trensz, obtient des réactions positives dans la trypanosomiose caméline et la leishmaniose canine. Or, ces deux affections ne comportent aucune production de pigments pouvant jouer le rôle d'« Endogènes ».

Trensz inocule une série de cobayes avec du trypanosome provenant d'un dromadaire atteint de debbab. Avant l'inoculation, le sérum de ces lapins ne flocculait nullement en présence des réactifs de Henry. La réaction se montra positive chez les cobayes infectés.

Les mêmes expériences sont faites sur un chien infecté expérimentalement de leishmaniose canine, et Trensz observe des flocculations massives dans le sérum.

Ceci démontre que la réaction de Henry peut être

positive dans le sérum d'animaux infectés avec des protozoaires ne produisant aucun pigment ferrugineux ni mélanique.

Mais de son côté, Chorine injecte dans l'organisme du lapin de la mélanine et des substances capables de produire du pigment ocre, afin de se rendre compte si ces éléments ne donneraient pas une réaction spécifique du sérum.

Des lapins, dont le sérum donnait une réaction de Henry négative, reçoivent de deux jours en deux jours 8 injections intraveineuses d'une dilution de mélanine provenant du sarcome du cheval.

Ces injections n'éveillent aucune réaction positive.

Une deuxième série de lapins reçoit des injections intraveineuses d'eau distillée à la dose de 20 cc. pour un lapin de deux kilogrammes environ. La déchéance globulaire que l'on obtient est intense et tous les animaux ont présenté une forte hémoglobinurie.

La réaction de Henry demeura néanmoins négative, alors que des coupes du foie ont révélé la présence d'une forte proportion de pigment ocre.

Tous ces faits semblent s'opposer à la théorie première de Henry qui fait jouer à ces pigments le rôle d'endogènes spécifiques.

Ainsi, à l'opposé de la conception de Henry, beaucoup d'auteurs essayent d'expliquer le mécanisme de la séro-floculation par un état physico-chimique particulier du sérum ; instabilité physico-chimique qui ne serait pas un caractère spécifique du sérum paludéen, mais une de ses principales caractéristiques.

Henry, cependant, estime toutefois que des confusions ont pu être faites entre la floculation mélanique vraie et des fausses floculations. Ainsi Trensztz qui avait d'abord trouvé la floculation constante chez les cobayes inoculés avec le Debbab, ne la trouve actuellement que dans une très faible proportion.

THEORIE DE TRENSZ

Trensz, frappé par la fréquence assez grande de la surfloculance des sérums paludéens, fut d'abord amené à admettre que surfloculance et mélanofloculation étaient deux phénomènes parallèles et identiques. Il y aurait un rapport précis entre le degré de la surfloculation et l'intensité de la mélanofloculation.

Le principe de la réaction serait dans une instabilité sérique particulière qui ne se manifeste qu'en présence de certains réactifs lorsqu'elle est faible, et qui, au contraire, apparaît en l'absence de tout antigène lorsqu'elle existe à un degré plus fort.

Cette instabilité sérique serait due à l'augmentation des euglobulines du sérum qui joueraient un rôle primordial dans le mécanisme de la réaction.

Trensz a en effet établi que l'intensité de la mélanofloculation est corrélative de la teneur du sérum en euglobulines. Les trois phénomènes de la floculation, de la surfloculation en eau distillée et de l'euglobulinémie, évolueraient parallèlement.

On pourrait objecter à cette conception que certains sérums de non-paludéens, à teneur englobulinémique élevée, surfloculent dans l'eau distillée, mais ne floculent pas en présence de mélanine.

Tout récemment, Trensz est arrivé à constater qu'il existerait des différences qualitatives entre les euglobulines paludéennes et les euglobulines de sérum normal.

Pour vérifier cette hypothèse, cet auteur extrait les globulines de sérum normal et de sérum paludéen et les met séparément en présence de mélanine. On constaterait ainsi la formation de précipités différents : les euglobulines normales donnant surtout une surfloculation, les euglobulines paludéennes donnant au contraire une mélanofloculation.

Ainsi les euglobulines paludéennes témoigneraient d'une affinité spéciale pour la mélanine, ce qui est un argument indirect en faveur de la spécificité.

THEORIE DE GILLES

Gilles effectue une analyse chimique de la mélanine et l'examen lui montre la présence d'une certaine proportion de fer.

Cet auteur émet l'hypothèse que la mélanine serait un réactif contenant une combinaison ferrique qui, fortement hydrolysée, mettrait en liberté l'hydrate de fer colloïdal.

La réaction de Henry serait, d'après Gilles, une simple floculation entre colloïdes de signe contraire ; l'hydrate ferrique étant électro-positif, l'euglobuline constituant l'émulsoïde négatif. La réaction de Henry ne ferait qu'objectiver une hypereuglobulinémie et tout comme la réaction de la formol-gélification de Gaté, elle témoignerait d'une aptitude du sérum à hydrolyser son euglobuline.

En somme, d'après la théorie de Gilles, toute maladie s'accompagnant d'une hypereuglobulinémie serait susceptible de donner la réaction de Henry.

Nous avons vu que, d'après Trensztz, la réaction serait toujours en rapport avec une hypereuglobulinémie, mais il y aurait des différences qualitatives entre ces euglobulines, les unes donnant la réaction de Henry, les autres ne la donnant pas. D'autre part, des sérums non hyper-globulinémiques peuvent donner des mélano-floculations positives.

THEORIE DE CHORINE ET GILLIER

Ces deux auteurs expliquent le mécanisme de la

réaction de Henry par l'intervention d'un déséquilibre colloïdo-cristalloïdien du sérum paludéen en présence d'eau distillée.

Un des premiers facteurs de ce mécanisme serait dû à la présence dans le sérum, de certaines substances caractérisées par une différence de solubilité dans le sérum, et dans l'eau distillée formolée.

C'est ainsi que l'addition de globulines augmenterait le pouvoir floculant du sérum ; additionnées à des sérums négatifs, elles les rendraient positifs. Il en serait de même pour le cholestérol, les lécithines, l'acide urique.

Un deuxième facteur invoqué par Chorine et Gillier serait la richesse du sérum en sels dissous. La réaction de Henry positive serait la manifestation d'un déséquilibre entre les substances dissoutes dans le sérum, la baisse de la concentration saline favorisant la floculation, son élévation la négativant.

Ainsi s'expliquerait le fait que la réaction de Henry est toujours négative au cours de l'accès fébrile. A ce moment, la concentration sanguine en sels de sodium et surtout en potassium serait très élevée et arrêterait la surfloculation dans l'eau distillée et par conséquent la mélanofloculation. Après l'accès, le potassium s'élimine en grande quantité par les urines et la réaction redevient positive.

D'après cette hypothèse, la réaction de Henry serait due uniquement à l'instabilité du sérum dans l'eau distillée. Le rôle de la mélanine se bornerait à celui d'un indicateur.

Voulant pousser plus loin l'étude de cette action de l'eau distillée sur les sérums normaux et pathologiques, Chorine et Gillier mélangent le sérum et l'eau distillée dans les proportions d'une partie de sérum pour neuf d'eau distillée et étudient l'intensité de la floculation au photomètre.

Nous avons vu la technique détaillée de cette réaction. Les auteurs concluent que les sérums normaux, syphilitiques et paludéens mélangés au dixième avec de l'eau distillée se distinguent nettement les uns des autres par l'intensité de leur floculation.

- Les sérums normaux floculent peu ou point.
- Les sérums syphilitiques floculent légèrement.
- Les sérums paludéens floculent avec intensité.

Dans une publication à la Société de Biologie (1935) Trepsz objecte, à propos de la concentration saline, que les ions salins n'agissent pas uniquement par leur concentration moléculaire, mais aussi par leur nature chimique. Ils peuvent avoir une action différente sur la floculation et sur la surfloculation des sérums paludéens.

Ces deux phénomènes sont aisément dissociables dans les milieux salins. Ils le sont également dans une certaine mesure en eau distillée. On ne peut donc les considérer comme identiques.

THEORIE MIXTE DE LE BOURDELLES ET LIEGEOIS

Dans l'état actuel des choses, il semblerait difficile de se prononcer pour la théorie biologique de Henry ou les théories physico-chimiques de Trepsz, Gilles et Chorine.

Il semble logique de se ranger actuellement à la théorie mixte de Le Bourdelles et Liégeois qui font intervenir dans le mécanisme de cette réaction des facteurs spécifiques et non spécifiques.

Les facteurs non spécifiques (eau distillée, formol, impuretés protéiniques de l'antigène mécanique), mettraient les sérums en état d'instabilité, « favorisant l'objectivation de la floculation provoquée par les fac-

teurs spécifiques, homologues des endogènes du paludisme ».

Dumolard et Aubry ayant signalé une inversion fréquente du rapport : $\frac{\text{sérine}}{\text{globuline}}$ chez les sujets grave-

ment impaludés et cachectiques. Le Bourdelles reprit cette étude et arrive à cette conclusion qu'il existe chez l'impaludé expérimental une perturbation assez notable de l'équilibre protéique du sérum, mais que ce fait ne suffit pas à expliquer le mécanisme de la réaction.

Par ailleurs, cet auteur, avec Velluz, a trouvé des mélano-floculations nettement positives avec taux normal des albumines et du cholestérol sanguin.

Cette conception biologique se rapproche sensiblement de celle de Henry lui-même.

Enfin, le point de vue de Henry. Le Bourdelles et Liégeois semble actuellement renforcé par les travaux de Kristchewski et de ses collaborateurs sur la mélanine haptène.

THEORIE DE LA MELANINE HAPTENE

On désigne sous le nom d'*haptène*, des corps incapables par eux-mêmes de déterminer la formation d'anticorps lorsqu'on les injecte à des animaux.

Si, au contraire, ces corps sont injectés en même temps que certains antigènes, les animaux injectés forment des anticorps non seulement contre l'antigène vrai, mais aussi contre les haptènes qui sont en quelque sorte des *demi-antigènes*.

Sachs, inoculant à des lapins de l'antigène de Wassermann, en même temps qu'un sérum de porc, obtint un sérum actif non seulement contre le sérum de porc, mais aussi contre l'antigène de Wassermann.

Kristchewski et Rubeinstein sont revenus sur la question. Injectant à des lapins de la mélanine choroïdienne de bœuf et du sérum de porc, ils n'obtinrent que 6 lapins sur 17 dont le sérum précipitait la mélanine.

Ils pensent alors qu'il vaut mieux s'adresser à des animaux d'un genre différent, et en particulier à des ovipares. Ils injectent de la mélanine et du sérum de porc à des oiseaux du genre *Acanthis Linaria* et *Spinus Spinus*. Ils obtiennent alors des sérums précipitant régulièrement la mélanine.

Bien entendu, avant les injections, les sérums de ces animaux n'étaient pas précipitants.

Ils allèrent plus loin et pensèrent que la mélanine des parasites peut jouer le rôle d'*haptène*, grâce au support du protoplasme des parasites et cela chez un même animal.

Ils saignent des oiseaux dont le sang est très parasité (*Acanthis Linaria*). Le sang est introduit dans des tubes ; ceux-ci sont laissés quarante-huit heures à la glacière, bouchés au coton imprégné de formol et capuchonnés. Puis on enlève capuchon et coton ; le tube est laissé trois heures à l'étuve pour évaporer le formol.

D'autres oiseaux du genre *Acanthis Linaris* sont injectés avec ce sang. Leur sang acquiert régulièrement des propriétés flocculantes vis-à-vis de la mélanine d'œil de bœuf.

Il résulte de ces expériences que la mélanine peut être considérée comme une *haptène*. La mélanine d'œil de bœuf aurait sans doute un élément aminé commun avec la mélanine paludéenne.

Et ces expériences font envisager que la théorie des « Endogènes » de Henry ne manque pas totalement de fondement.

Les Résultats
Les Intérêts pratiques
de la Mélando-Floculation

LES RESULTATS DE LA MELANO-FLOCCULATION

Depuis 1927, de nombreux documents ont été apportés qui assurent à la réaction de Henry une valeur indéniable. La statistique de Henry, qui porte à l'heure actuelle sur plus de 7.000 sérums examinés, celles de Le Bourdelles et Liégeois, celles de Trenszy, de Chorine, de Corradetti, celles toutes récentes de Fargeot, de Raynal et de Meersseman arrivent à des conclusions extrêmement voisines et constituent un critérium des plus imposants en faveur de la sensibilité et de la spécificité de la réaction.

De l'ensemble des études et des publications statistiques intéressant la mélanoflocculation, on peut dégager toute une série de conclusions qui sont actuellement admises par tout le monde. Il semble donc inutile de publier toutes les statistiques déjà fournies.

Chez les paludéens

a) La réaction est reconnue positive, chez les primo-impaludés à partir du cinquième et sixième accès et pendant les intervalles apyrétiques. Le pourcentage de positivité est voisin de 100 %.

b) La flocculation s'atténue considérablement et peut même disparaître lors des accès fébriles.

c) Au cours du paludisme de récurrence, le pourcentage de la positivité est de l'ordre de 95 à 100 %.

d) En cas de paludisme chronique, elle est reconnue positive dans 80 à 90 % des cas.

e) Chez les anciens paludéens, soumis à une infestation de courte durée et rapatriés, les réactions positives ont un pourcentage général de 5 % ; au contraire, si le sujet a été soumis à plusieurs réinfections, le pourcentage de positivité s'élève à 30 ou 50 %, même en l'absence de lésions viscérales.

Mélano-floculation en dehors du paludisme

Nous avons vu que certains sérums riches en globulines avaient la propriété de flocculer en eau distillée. C'est le phénomène de la surfloculance qui serait le fait de certaines viscéropathies.

Dans ce cas, cette fausse floculation peut prêter à confusion et faire conclure à une réaction positive. Le seul moyen d'éviter l'erreur est d'observer rigoureusement et soigneusement les tubes témoins et de n'accepter que comme seules positives les floculations qui se produisent seulement en eau salée. Cette cause d'erreur mise à part, on peut affirmer que la mélano-floculation est négative chez les sujets sains.

Elle a été reconnue positive dans certaines affections diverses et en particulier dans quelques cas de maladies du système hématopoiétique, telles que la leucémie, et l'anémie pernicieuse.

De même on l'aurait vue positive dans quelque cas de typhus exanthématique et de Kala-azar, dans certaines formes de syphilis et dans l'ictère hémolytique.

Chez l'animal, Trensztz l'a observée chez des cobayes infectés par le trypanosome de Deblab du dromadaire et Chorine dans la spirochétose des poules, où on a d'ailleurs des pigments ferriques dans le foie.

Nous avons vu que, Henry a indiqué un moyen de distinguer les fausses floculations des vraies flocula-

tions. Le chauffage à 55° supprime la vraie floculation, la surfloculation banale, que l'on peut observer, d'ailleurs, chez les vieux paludéens étant peu modifiée.

INTERET PRATIQUE

La réaction de Henry trouve de nombreuses indications au cours du paludisme. Son intérêt est capital, tant au point de vue diagnostique que thérapeutique. De plus, la mélanofloculation peut être d'un secours précieux dans les enquêtes malariologiques sur l'endémie palustre.

a) Intérêt diagnostique

En ce qui concerne le diagnostic, il est indiqué de pratiquer la réaction de Henry toutes les fois que l'on soupçonnera l'infection palustre, quelle que soit la forme sous laquelle elle se présente.

Dans le paludisme de primo-invasion, la découverte de l'hématozoaire dans le sang est évidemment le critère de choix. Mais bien souvent sa constatation est difficile et même impossible, en particulier dans certaines formes à *plasmodium procox*. Le diagnostic clinique de ces formes de début peut être très difficile, la maladie se présentant souvent sous l'aspect d'une pyrexie irrégulière, pseudo-continue, à type de typhoïde, ou à chutes thermiques inexplicables.

Dans ce cas, la malaria-floculation, qui se montrera intensément positive du cinquième au septième jour, viendra confirmer ou redresser un diagnostic hésitant.

Dans le paludisme à rechutes, la réaction de Henry trouve tout son intérêt dans l'intervalle des accès.

Nous avons vu en effet qu'elle pouvait s'atténuer et même disparaître pendant l'accès. Or c'est précisément pendant ces intervalles que la recherche de l'hématozoaire est la plus difficile. Elle échoue même le plus souvent.

Au cours du paludisme chronique, avec grosses lésions viscérales (hépatomégalie, splénomégalie), et sans accès fébriles, la réaction demeure positive dans 85 à 90 % des cas, alors que le parasite ne peut être le plus souvent décelé.

Enfin, la malaria-floculation peut rendre des services incontestables dans le paludisme latent, et permettre un traitement adéquat.

b) Intérêt thérapeutique

Tout comme le Wassermann dans la syphilis, la réaction de Henry est, dans le paludisme, un des meilleurs moyens de contrôler un traitement et d'affirmer une guérison définitive.

Aussi longtemps que la réaction demeure positive, on peut affirmer que le sujet est exposé à de nouvelles rechutes et ne peut se considérer comme définitivement guéri.

La négativation de la réaction demande des délais très variables, et d'autant plus longs que le sujet demeure en pays d'endémie et soumis à des réinfestations fréquentes. Elle se négative au contraire très rapidement chez des malades victimes d'une seule infestation et rapatriés rapidement.

Avant la négativation définitive de la réaction, on assiste souvent, pendant un délai variable, à des intervalles de positivités suivis de reprises de négativation.

Ainsi, il faut considérer actuellement la malaria-

floculation comme un contrôle thérapeutique précieux qui permettra, au cours d'un traitement palustre, de dresser chez le paludéen des courbes très sensibles, et analogues à celles de Vernes chez le syphilitique. Pour l'établissement de ces courbes, on s'adressera de préférence, pour plus de précision, à la méthode photométrique, et particulièrement à celle que Trenszt vient de mettre au point et que nous avons exposée plus haut.

c) Intérêt épidémiologique

Toutes les fois qu'au cours d'une enquête malarialogique on aura à établir l'index endémique d'une région impaludée, il sera indiqué d'adjoindre, aux index splénique et plasmodique, l'index sérologique.

Actuellement, l'accord n'est pas encore fait sur la valeur comparée de ces trois index.

D'après Trenszt et Henry lui-même, l'index splénique demeure le procédé métrique de choix, quand il est positif.

La sérologie, quoique moins fidèle, ne perd pas pour cela tous ses droits.

D'autres auteurs (Tzerchnowitzer) pensent au contraire que l'index sérologique se montre supérieur aux deux autres.

Quoi qu'il en soit, il n'en résulte pas moins de ces discordances que la méthode sérologique est d'un grand intérêt au point de vue épidémiologique et on a tout avantage, sinon à la pratiquer exclusivement du moins à la jumeler avec l'autre méthode.

CONCLUSIONS

I. — Divers auteurs ont d'abord cherché à établir un séro-diagnostic du paludisme en se servant d'extraits divers d'organes et de sang renfermant des hématies comme antigènes.

II. — Ces recherches peu fructueuses ont été remplacées par un procédé découvert par Henry, considérant les pigments palustres comme pouvant jouer le rôle d'antigènes d'origine interne : les Endogènes.

III. — Ces pigments modifiant l'état colloïdal du sérum donnent lieu à un état particulier de flocculabilité.

IV. — A défaut de pigments vrais pour mettre en évidence une flocculation, Henry s'est servi de sels de fer et de mélanine choroïdienne, réactifs de substitution.

V. — Certains auteurs ont essayé de mettre en évidence directement la flocculabilité. Chorine l'a étudiée directement en présence d'eau distillée. Prudhomme a voulu la déceler par le carmin en suspension.

La flocculabilité en eau distillée n'est simple qu'apparence et donne plus de flocculations non spécifiques que la flocculation à la mélanine. La suspension de carmin est peu stable.

VI. — Parmi les mélanines, la mélanine choroïdienne est la plus utilisée. La mélanine en suspension donne de très bons résultats en macroscopie. En pho-

tométrie, elle est utilisable si le titre est stabilisé et si l'on dispose des tubes témoins renfermant de la mélanine et du sérum chauffé.

VII. — Les mélanines solubles obtenues par dissolution de mélanine choroïdienne ou de mélanine de cheveux paraissent très utilisables en photométrie. Elles n'ont pas encore fait leur preuve en macroscopie.

VIII. — L'emploi du tube témoin avec mélanine et sérum préalablement chauffé paraît très recommandable (Henry, Villain).

IX. — Le mécanisme de la réaction de mélanoflocculation est encore incomplètement élucidé. Il est probable qu'à côté d'un élément spécifique des facteurs non spécifiques entrent en jeu. Il paraît exister des mélanines mélanosensibles plus spéciales au paludisme (Trensz). La mélanine pourrait être une haptène (Kristchewski).

X. — La réaction est très utilisable pour le diagnostic, pour le contrôle thérapeutique et dans un but épidémiologique.

XI. — Le présent travail a eu surtout pour but de documenter les travailleurs et de permettre une étude plus complète, de la réaction, de sa nature et de son emploi.

Vu :
LE DOYEN,
ROUSSY.

Vu :
LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE
BRUMPT.

Vu et permis d'imprimer :
LE RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,
S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

- ABRAMI et SENEVET. — Recherches sur la pathogénie du paludisme à plasmodium falciparum. Rôle de l'immunité. La réaction shizontolitique. Mécanisme des rechutes. *Bull. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 16 mars 1917, pp. 519-534.
- ADIDA (P.). — La réaction de floculation dans le paludisme. *Gaz. des Hôp.*, n° 63, 7 août 1929, p. 1137.
- Le paludisme. Revue générale. *Gaz. des Hôp.*, n° 26, 1930, p. 475.
- ALCAY, CATTOIR (E.) et MARILL (G.). — La réaction de Henry chez les paludéens porteurs d'hématozoaires et dans le paludisme d'innoculation. *Com. à la Soc. de Méd. d'Alger*, décembre 1932.
- BENHAMOU et GILLES (R.). — Les facteurs chimiques de la malaria-floculation (réaction de Henry dans le paludisme anophélien. *C. R. Soc. Biol.*, T. CXX, n° 40, 1935 p. 1259.
- Les modifications sériques au cours de la malaria-thérapie. *C. R. Soc. Biol.*, T. CXVIII, 1935, pp. 1334-1336.
- Les conditions de floculation et de gélification des sérums pathologiques. *C. R. Soc. Biol.*, T. CXX, 1935, p. 428.
- BONNET (A.). — Quelques cas de troubles nerveux d'origine palustre. Utilité diagnostic de la réaction d'Henry. *Rapp. au II^e Congrès Intern. du Paludisme*, Alger, 1930.
- CARNOT (P.). — Sur le mécanisme de la disposition des shizontes dans le sang périphérique au cours des accès de paludisme. *C. R. Soc. Biol.*, T. LXXX, 1917, p. 575.

- CASANA-COSTELIA et MOLINE (J.) (Espagne). — Contribution à l'étude de la séro(floculation du paludisme (réaction de Henry). *Com. au II^e Congrès Inter. du Paludisme*, Alger, 1930.
- CELLI (P.). — Sull' immunità dall' infezione malarica (atti della Soc. per gli studi della malarica, 1901.
- CHABRELLE (L.). — Contribution à l'étude de la séro-floculation du paludisme (réaction de Henry). *Thèse de Lyon*, 1928.
- CHORINE (V.). — Réaction de Henry dans le diagnostic du paludisme. *Rivista di malarologia*, Anno XI, Fasc. 3, 1932.
- Evolution de la réaction de Henry et surfloculance du sérum. *Bull. Soc. Path. Exot.*, T. XXVI, 1933, pp. 269-273.
- La séro-floculation de Henry dans la spirochétose des poules. *C. R. Soc. Biol.*, T. CXII, 1933, pp. 1164-1165.
- La réaction de Henry et le diagnostic du paludisme. *Bull. Soc. Path. Exot.*, T. XXVI, 1933, p. 1249-1252.
- CHORINE (V.) et GILLIER (R.). — Sur le mécanisme de la réaction de Henry au cours de l'infection paludéenne. *Acad. des Sciences*, 23 octobre 1933.
- Recherches sur le mécanisme de la réaction de Henry. *C. R. Soc. Biol.*, T. CXIII, 1933, p. 1419 et *Ann. de l'Inst. Pasteur*, LII, 1934, pp. 193-216.
- CHORINE (V.) et KOECHLIN (D.). — Influence de la conservation des sérums sur la réaction de Henry. *C. R. Soc. Biol.*, T. CXVI, n° 16, 1934, p. 19.
- CHORINE (V.) et PRUDHOMME. — Floculation des sérums dans l'eau distillée. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, T. CXV, p. 290.
- CHORINE (V.) et RODIEUX (Mlle). — La réaction de Henry et le diagnostic du paludisme. *Presse Médicale*, 1934, T. I, p. 198.
- CHORINE (V.). — Floculation du sérum dans l'eau distillée pure ou additionnée de mélanine. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, T. CXVIII, p. 335.

- CHORINE (V.). — Rôle des graisses et de la cholestérine dans la réaction de Henry. *C. R. Soc. Biol.*, T. CXXI, 1936, p. 227.
- CHWATT. — Influence de l'hyperthermie provoquée sur la réaction de Henry. *Bull. Soc. Path. exot.*, T. XXVII, 1934, p. 432.
- CORRADETTI. — Le reazione di Henry nell' infezione malarica. *Riv. di Malariologia*, anno XI, fasc. 3, 1932, pp. 282-300.
- DEJUST (M.-L.). — Pigments mélaniques et pigment de la peau humaine. *Bull. de la Soc. de Chimie Biologique*, T. IX, n° 10, décembre 1927, pp. 1164-1182.
- DRIGUEZ (G.). — De la mélanofloculation (réaction de Henry) au cours du paludisme. *Thèse d'Alger*, 1933.
- FARGEOT. — Résultats de 100 séro-floculations de Henry. *Bull. Soc. Path. exot.*, T. XXVI, 1933, p. 428.
- GARBIES (J.). — Le pigment malarique. *Thèse de Bordeaux*, 1933-1934, n° 93.
- GILLES (R.). — Les conditions physico-chimiques de la réaction de Henry. *C. R. Soc. Biol.*, T. CXII, 1933, p. 334.
- GREIG, ROOYEN et HENDRY. — Observations on melano-precipitations serological reaction in malaria. *Tr. Roy. trop. med. and hyg.*, T. XXVIII, 1934, pp. 175-191.
- Chemistry of malarial serum, with reference to factors concerned in melano-precipitation test. *J. Trop. Méd.*, T. XXXVII, 1934, p. 289-295.
- GRIXONI (G.). — L'agglutinazione dell' sangue malarico. *Gaz. degli Ssped et delle Clin.*, 190.
- HENRY (A.-F.-X.). — Etude sérologique de l'infection palustre. *II^e Congrès pour l'avancement des sciences*, Constantine, 1927. — *Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1927, p. 702.
- Etudes sérologiques sur le paludisme. *Revue Tunisienne des Soc. Méd.*, mai 1927, p. 153.
- Contribution à l'étude sérologique de l'infection palustre. *Algérie Médic.*, septembre 1927, n° 9, p. 557.
- Etude sérologique de l'infection palustre. *Paris Médical*, 23 juin 1928, T. I, pp. 528-588. — *C. R. Soc. Biol.*, T. LXXXIX, 1928, pp. 819-821.

- Etude sérologique de l'infection palustre. *La Médecine Prat.*, 30 novembre 1928, n° 9, p. 242.
- Nouvelle technique de ferro-floculation pour l'étude sérologique du paludisme. *C. R. Soc. Biol.*, Lyon, T. C, 1929, pp. 671-674.
- La sérologie de l'infection palustre. Son intérêt clinique. *Lyon Méd.*, T. CXXXIII, 3 mars 1929, T. I, pp. 256-259.
- Le diagnostic du paludisme par la photométrie de la floculation. *C. R. Soc. Biol.*, T. CI, 1929, pp. 261-264.
- Les méthodes photométriques de la séro-floculation dans le diagnostic du paludisme (photométrie de la ferro-floculation). *C. R. Soc. Biol.*, T. CI, 1929, pp. 259-261.
- Séro-floculation palustre. Conditions d'observation, interprétation et discussion des résultats. *C. R. Soc. Biol.*, T. CI, 1929, pp. 1026-1029.
- La sérologie de l'infection palustre. Son intérêt clinique. *Paris Médical*, 1929, pp. 626-627.
- Séro-floculation palustre. Méthodes photométriques. *Arch. de l'Inst. Prophylactique*, octobre-décembre 1929.
- Séro-floculation palustre. *C. R. du II^e Congrès International du paludisme*, 19 mai 1930, Alger, T. I, pp. 750-777.
- La séro-floculation et l'examen des frottis sanguins dans le diagnostic et le traitement du paludisme. *Paris Médical*, T. I, 31 mai 1930, pp. 496-499.
- Séro-floculation palustre. (Malaria floculation). *Arch. Ital. di sc. méd. colon.*, T. XI, 1^{er} décembre 1930, pp. 723-743.
- Malaria-floculation. Les antigènes. Observation macroscopique des résultats. *C. R. Soc. Biol.*, T. CVII, 1931, p. 1520.
- Considérations sur le paludisme chronique. Pathogénie. Diagnostic. Traitement. *Paris Médical*, 1932, n° 23, juillet.
- Le séro-diagnostic du paludisme (malaria-floculation). *La Médecine*, n° 17, décembre 1932.

- Paludisme et réaction de Henry. *Presse Médicale*, 1932, T. I, p. 938.
- Mélano-floculation. Formolage des tubes témoins. Alcalinisation des liquides de dilution. *C. R. Soc. Biol.*, T. CXII, 1933, p. 765.
- Malaria-floculation (réaction de Henry). *Revue critique de Path. Thérap.*, n° 24, 1934.
- A propos de la séro-floculation dans le diagnostic du paludisme. Sa technique et son application dans la pratique. *Revue des Progrès Thérap.*, n°s 4 et 5, avril et mai 1934.
- A propos de la densité optique dans les techniques sérologiques, photométriques et en particulier dans la malaria-floculation. *C. R. Soc. Biol.*, T. CXV, n° 14, p. 1606.
- Les fausses floculations en sérologie palustre. *C. R. Soc. Biol.*, T. CXVI, n° 27, 1934.
- Méactifs mélaniques et mélano-ferriques solubles et en suspension. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, T. CXVIII, n° 6, p. 501.
- Mélano-floculation en dehors du paludisme et instabilité sérique. *C. R. Soc. Biol.*, T. CXVIII, 1935, p. 1443.
- Floculation mélanique et instabilité sérique. Courbes de malaria-floculation. Le clavier sérologique du paludéen. *C. R. Soc. Biol.*, CXIX, n° 21, 1935, p. 597.
- HUGUENIN. — Le paludisme d'innoculation. Etude clinique et expérimentale. *Thèse d'Alger*, 1933-1934, n° 34.
- KAPPUS (A.). — Ueber die Henry'sche Malariareaktion. *Arch. für Schims u. Tropenhygiene*, 36, T. II, 1932, pp. 576-586.
- KRITCHEWSKI (I.-L.) et DEMIDOVA. — Das phanomen der melano-flokulation bei der experimentellen vogelmalaria. *Zeitschr. für Immunitätsforschung und exp. Thérap.*, 1933, T. 80, p. 135.
- KRITCHEWSKI (I.-L.) et RUBINSTEIN (P.-L.). — Ueber die antigenatur des melanius. *Ztschr. f. Immunitätsforsch. u exper. Thérap.*, T. 84, 1935, pp. 397-404.

- LACOUR (P.). — Recherches sur la malaria-floculation de Henry. *Thèse de Lyon*, 1933.
- Recherches sur la malaria-floculation de Henry. Sa sensibilité. Sa spécificité. Sa valeur pratique. Vol. in-8°, de 68 pages. *Doin*, éditeur, Paris, 1934.
- LAVERGNE (J.) et MONIER (H.). — Utilisation de la séro-floculation de Henry dans le diagnostic et le traitement du paludisme. *Bull. Soc. Path. exot.*, T. XXIV, 1931, p. 539.
- LE BOURDELLES (B.) et LIEGOIS (R.). — Contribution à l'étude de la réaction de Henry : Ferro et mélando-floculation. Sa valeur dans le diagnostic de l'infection palustre. *C. R. Soc. Biol.*, T. LXXXXVIII, 1928, pp. 1342-1344.
- La notion d'endogènes. La portée biologique générale. *C. R. Soc. Biol.*, T. 98, 1928, pp. 1340-1342.
- La réaction de Henry ; son intérêt clinique et épidémiologique. *Journal de Méd. de Lyon*, n° 5. 31 janvier 1929, p. 96.
- Sur la mélando-floculation. Influence du temps de réaction. Les aspects du floculat en eau distillée et en eau salée, leur signification. — *C. R. Soc. Biol.*, T. CI, pp. 456-468 et 1448-1449.
- La séro-floculation du paludisme (réaction de Henry). Son intérêt clinique. *Bull. et Mém. Soc. des Hôp. Paris*, T. 53, 18 octobre 1929, p. 1196-1202.
- La séro-floculation du paludisme. *Soc. de Méd. milit. Franç.*, n° 2, février 1930, p. 27.
- LE BOURDELLES (B.), LIEGEOIS (R.) et CHABRELIE (L.). — La séro-floculation du paludisme (réaction de Henry). *Arch. de Méd. et de Pharm.*, t. XCII, n° 2. Fév. 1930; p. 179-206.
- LE BOURDELLES (B.) et LIEGEOIS (R.). — La séro-floculation du paludisme (réaction de Henry). Ses résultats cliniques. *C. R. du II^e Congrès international du paludisme*, Alger, 10-21 Mai 1930, t. I, p. 750-777.
- LE BOURDELLES (B.). — A propos de la séro-floculation du paludisme. *Arch. de Méd. de Pharm. milit.*, T. LXXXIII, Juillet 1930, p. 121-124.

- " La séro-floculation du paludisme (réaction de Henry).
Son intérêt clinique et épidémiologique. *Rev. méd. franç.*, T. II, Oct. 1930, p. 721-730.
- LE BOURDELLES (B.) et VELLUZ (L.). — Malaria-floculation de Henry et protéinies du sérum palustre. *C. R. Soc. biol.*, t. CVIII, 1931, p. 402-403.
- LE BOURDELLES (B.). — Malaria-floculation et paludisme chronique. *Bull. et Mém. de la Soc. de Méd. des Hôp. de Paris*, 3^e série, n° 19, 12 Juin 1933.
- LE BOURDELLES (B.) et FRIBOURG-BLANC (A.). — Malaria-floculation et malariathérapie. *Bull. Soc. méd. des Hôp. Paris*, 49^e année, n° 24, 7 Juillet 1933, p. 1013.
- LE BOURDELLES (B.). — Les troubles humoraux des protozooses sanguines. *Revue médicale française*, 1934.
- LIVIERATO (S.), VAGLIANO (M.) et CONSTANTAKATO (G.). — Utilisation d'un nouvel antigène pour le diagnostic de la malaria-floculation de Henry. *C. R. Soc. biol.*, t. CXII, 1932, séance du 7 Mai.
- LOURTEAU. — Contribution à l'étude de la séro-floculation de Henry. *Thèse de Toulouse*, 1936.
- MEERSSEMAN (F.) et LACOUR (P. R.). — Recherches sur la réaction de la malaria-floculation de Henry. *C. R. Soc. biol.*, T. CXII, 1933, p. 908.
- La malaria-floculation de Henry. Son intérêt théorique et pratique. *Soc. méd. des Hôp. de Lyon*, dans *Lyon Médical* du 27 Mai 1934, p. 632.
- La séro-floculation du paludisme (réaction de Henry); sa valeur, sa technique, son mécanisme. *Presse Médicale*, n° 49, 20 Juin 1934.
- MEERSSEMAN (F.) et LAFUMA. — Le contrôle sérologique du traitement antipalustre par la réaction de Henry. *C. R. Soc. biol.*, T. CXXI, n° 1, 1936, p. 52.
- Floculation spécifique et floculation banale dans la réaction de Henry. Intérêt des lectures photométriques en eau salée. *C. R. Soc. biol.*, T. 121, 1936, p. 52 à 54.
- PICADO (C.). — Nouvelle réaction sérologique pour le paludisme. *C. R. Soc. biol.*, 1929, t. I, p. 479.

- POZZI (A.). — La reazione di Henry nella malaria. *Il polilino, sezione medica*, n° 8, 1930, p. 361.
- PRUDHOMME. — Flocculation du sérum dans l'eau distillée et réaction de Henry. *C. R. Soc. biol.*, t. CXX, n° 38, 1935.
- Les différents indicateurs remplaçant la mélanine dans la réaction de Henry. *C. R. Soc. biol.*, 1935, t. 119, p. 1115.
- RAYBAUD (A.). — Le séro-diagnostic du paludisme. Les réactions de Henry. *Marseille Médical*, 1930, n° 16, p. 725.
- RAYNAL. — La réaction de Henry au Tonkin. Résultats de 853 mélanoflocculations. *Bull. Soc. path. exot.*, t. 29, 1936, p. 75.
- ROCCHI (F.). — Ricerche sul pigmento malarico con speciale riguardo alle reazioni di Henry. *Arch. ital. di anat. e istol. pat.*, t. I, 1930, p. 613.
- SABATUCCI (M.). — La reazione di flocculazione nell'infezione malarica. *Riv. dit. Malariologia*, T. VII, n° 6, 1928, p. 853.
- SERVANTON. — La mélanoflocculation de Henry (Malaria-réaction). *Thèse de Bordeaux*, 1933-34, n° 95.
- STEPHENS (J.-W.) et CHRISTOPHERS (S.-R.). — The agglutination of sporozoites. *Report of malaria committee*, 1900.
- THEOBALT (F.). — La malaria-flocculation de Henry. Etude de 100 cas cliniques. *Bull. Soc. de méd. des Hôp. de Paris*, t. 19, 1933, p. 753.
- TRENSZ (F.). — Essais d'application de la réaction de Henry à l'étude épidémiologique du paludisme. *Bull. Soc. Path. exot.*, t. 25, 1932, p. 310-314.
- Le rôle du pH des réactifs dans la séro-flocculation du paludisme. (Réaction de Henry). *Bull. soc. Path. exot.*, 1932, t. XXV, pp. 221-234.
- Recherches sur la séro-flocculation palustre (réaction de Henry). *Arch. Inst. Pasteur Algérie*, Déc. 1932, T. X, p. 443.
- La séro-flocculation palustre de Henry dans la trypanosomiase caméline et la leishmaniose canine expérimentales. *Bull. Soc. path. exot.*, t. XXV, 1932, p. 230.

- TRENSZ (F.) et Mlle JARDON (M.). — Les protides du sérum et la réaction de Henry dans la trypanosomiase expérimentale. *Bull. Soc. path. exot.*, t. XXVI, 1933, p. 442.
- TRENSZ (F.). — Technique de la séro-floculation palustre par la mélanine chororoidienne purifiée rendue soluble dans l'eau distillée. *Arch. Inst. Pasteur*, Algérie, 1935, t. XIII, n° 1, p. 11.
- Sur les caractères distinctifs entre la floculation et la surfloculation du sérum de paludéens. *C. R. Soc. biol.*, 1935, t. CXVIII, n° 1, p. 11.
 - Sur les différences qualitatives qui existent entre les englobulines du sérum de paludéen et les englobulines du sérum normal dans leur rapport avec la séro-floculation palustre de Henry. *C. R. Soc. biol.*, t. 118, 1935, p. 1076.
 - Des réactions qui existent entre les euglobulines et la surfloculation des sérums dans l'eau distillée. *C. R. Soc. biol.*, t. CXVIII, 1935, p. 1932-33.
- TZECHOWITZER (M.M.), GORCHOWA (E.L.), MOLDVASKAYA (W.D.), KRISTCHEWSKAYA :
- Henry melano-floculation reaction as a new method of serodiagnosis in malaria. *Trop. med. i vet.*, 1931, n° 9, p. 372.
 - Die melano-flokulation bei malaria. *Zentralblatt für Bakteriologie*, alt. 1., t. CXXVI, Déc. 1932, p. 414.
- VIALATTE (Ch.) et REMONTET. — Paludisme viscéral. Prémunition et réaction de floculation de Henry. *Bull. Soc. path. exot.*, 1930, p. 590.
- VILLAIN (G.). — Guide pratique d'examen microscopique du sang appliqué au diagnostic du paludisme. Supplément à la *Biologie médicale* 1935.
- VILLAIN (G.) et DUPOUX. — Contribution à l'étude sérologique du paludisme mélanine artificielle :
- 1^{re} note : *Bull. Soc. path. exot.*, t. XXVIII, Déc. 1935, n° 10.
 - 2^e note et 3^e note : *Bull. Soc. path. exot.*, t. XXIV, 1936, n° 2.

Nous avons pu nous procurer les dernières indications du Docteur Henry, sur son nouveau réactif et sa dernière technique que nous avons exposée.

Ces documents paraîtront bientôt dans le « Bulletin de la Société de Pathologie exotique ».

TABLE DES MATIERES

Introduction	11
Historique	13
Données sur les pigments palustres.....	17
Mélanine	17
Pigment ocre	20

LA RÉACTION DE HENRY. HYPOTHÈSE DE HENRY TECHNIQUE

Principes de la réaction de Henry.....	23
La réaction de Henry. Technique.....	25
Technique de la Ferro-Floculation.....	31

LES AUTRES RÉACTIONS DE SÉRO-FLOCULATION *Modifications de la Réaction de Henry*

Technique de la Mélano-Floculation avec des mélanines solubles	39
A. — Mélanine solubilisée par les alcalis	40
B. — Mélanine solubilisée par un acide	50

DIVERSES THÉORIES SUR LE MÉCANISME DE LA RÉACTION DE HENRY

Théorie de Henry	69
Théorie de Trenz	72

Théorie de Gilles	73
Théorie mixte de Le Bourdelles et Liégeois.....	75
Théorie de la mélanine haptène.....	76

LES RÉSULTATS

LES INTÉRÊTS PRATIQUES DE LA MÉLANO-FLOCCULATION

Les résultats de la mélano-flocculation.....	81
Conclusions	87
Bibliographie	89

